

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 19 OCT 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

T15



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts Biotest 29 113	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/05827	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 23/06/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 14/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K1/20		
Anmelder BIOTEST PHARMA GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 9 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☒ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 12/12/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 17.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Lopez Garcia, F Tel. Nr. +49 89 2399 2171 

I. Grundlag d s Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-3,5-26 ursprüngliche Fassung

4,4a eingegangen am 19/07/2001 mit Schreiben vom 18/07/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-27 eingegangen am 19/07/2001 mit Schreiben vom 18/07/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/6-6/6 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☒ Ansprüche, Nr.: 28,29
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 27 (teilweise).

Begründung:

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☒ Für die obengenannten Ansprüche Nr. 27 (insofern nicht recherchiert) wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:

- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
- ☐ die Ansprüche eingeschränkt.
 - ☐ zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - ☐ zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - ☐ weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. ☒ Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
- ☐ erfüllt ist
 - ☐ aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
- ☒ alle Teile.
 - ☐ die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-26
	Nein: Ansprüche	27
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	22-26
	Nein: Ansprüche	1-21
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-27
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

1. Der Bericht des Anspruches 27 wurde sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung / Zusammensetzung durchgeführt. (siehe ISA 210).
2. Die mit Schreiben vom 18.07.01 eingereichten Änderungen erfüllen die Erfordernisse des Artikels 34 (2) b) PCT.

Zu Punkt III

Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

1. Der Bericht des Anspruches 27 wurde sich nur auf die angeführten Wirkungen der Verbindung / Zusammensetzung durchgeführt. (siehe ISA 210).

Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die Herstellung und Präparaten von bekannten Verbindungen keine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen (Regel 13.1 PCT).

Daher, die verschiedenen Erfindungen / Gruppen von Erfindungen sind:

- I. Ansprüchen 1-26: Verfahren zur präparativen Fraktionierung von Plasma oder Serum.
- II. Anspruch 27: Verwendung eine Immunoglobulinpräparates oder eines Antithrombin III-, Albumin- oder Transferrin zur Herstellung eine Medikamentes.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: HRKAL JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 242, 1982, S. 385-388.

D2: US-A-5 429 746

D3: EP-A-0 339 919

D4: EP-A-0 717 049

D5: GOHEEN JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 326, 1985, S. 235-241.

D6: SZEPESZ LC-GC INTERNATIONAL (LIQUID AND GAS
CHROMATOGRAPHY), 5, 1992, S. 24-29.

2. Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein Verfahren zur präparativen Fraktionierung von Plasma oder Serum, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Ausgangslösung, welche Plasma oder Serum enthält ohne Rivanolfällung einer hydrophoben Interaktions-chromatographie unterwirft und mit einem stufenweisen Salzgradienten eine Immunoglobulin- und eine Albumin-haltige Fraktion erhält.
- 3.1. Da die Dokumente D1-D5 linearen Gradienten offenbaren, ist der Gegenstand der Ansprüche 1-26 gegenüber D1-D5 neu (Art. 33(2) PCT).
- 3.2. Die Verwendung des Anspruches 27 sind nicht neu (Art. 33(2) PCT). Immunoglobulin-, Antithrombin III-, Albumin- oder Transferrin-Präparates sind schon bekannt (z.B. D2, Sp. 5, 2. Abs.; D3, S. 2, Z. 21-22). Mit vorliegendem Verfahren hergestelltes Immunoglobulin, Antithrombin III, Albumin oder Transferrin, unterscheiden sich nicht von anderem Immunoglobulin, Antithrombin III, Albumin oder Transferrin, die mit bekannten Verfahren hergestellt werden.
4. Das Dokument D5, als nächstliegender Stand der Technik angesehen, offenbart ein Verfahren zur Fraktionierung von Humanserum ohne Rivanolfällung mittels eines linearen Ammoniumsulfatsalzgradienten durch eine hydrophobe Interaktions-chromatographie (HIC), von der sich der Gegenstand gemäß Anspruch 1 dadurch unterscheidet, dass der Salzgradient "stufenweise" durchgeführt wird.

Im Hinblick auf diesen Stand der Technik, liegt das zu lösende technische Problem darin, ein alternatives Verfahren zur Plasma oder Serum-Fraktionierung

zu finden.

Die vorgeschlagene Lösung wird aus folgenden Gründen nicht als erfinderisch betrachtet (Artikel 33(3) PCT):

- a) Lineare Methode zur Trennung von Serum in Albumin- und Igs-Fraktion mittels eines HIC sind schon bekannt (siehe D5 S. 239, Abs. 3, I. 1-2).
- b) Es ist auch bekannt, dass Albumin und Igs unterschiedliche Hydrophobizität besitzen (siehe D5 S. 239, Abs. 2 I. 4-5 und Abs. 3, I. 1-2), d. h., Albumin und Igs eluieren mit 2 **definitive getrennten** Salzkonzentrationen eluieren. Es ist aus D5 zu sehen, dass Albumin bei ungefähr 0.85 M Ammoniumsulfat und Ig bei ungefähr 0.25 M Ammoniumsulfat eluieren.
- c) Es scheint somit **naheliegend** für den Fachmann zu sein, wenn er Albumin und Igs abtrennen will und Punkte a) und b) kennt, von einer Salzkonzentration, an der Albumin eluiert, zu einer Salzkonzentration, an der Ig eluiert, Stufenweise zu wechseln, d.h. von ungefähr 0.85 M Ammoniumsulfat zu ungefähr 0.25 M Ammoniumsulfat, zu ändern (siehe D5 Abb. 1 und 5).
- d) Da Verbindungen, die in einer analytischen Säule getrennt werden können, in einer präparativen Säule auch getrennt werden können, kann dann dieses Merkmal ("präparativ") nicht als erfinderisch angesehen werden. Die Optimierung der Bedingungen einer Präparativsäule ist eine dem Fachmann **übliche Praxis**, sobald er die Bedingungen in einer analytischen Säule kennt.
- e) Die Methoden gemäß D5 werden an 0°C, wegen der Stabilität der Serumkomponenten und nicht nur wegen der etwas besseren Auflösung des Chromatogramms, durchgeführt (siehe D5, S. 236, Abs. 5 und S. 239, Abs. 2).
- f) Dass größere Mengen Ausgangsmaterial in einem Chromatographiezyklus als in D5 prozessiert werden kann erscheint nicht überraschend ist, weil **größere Säulen** benutzt werden.

Daher kann der Gegenstand der Ansprüche 1-7, 10-17 nicht als erfinderisch

angesehen werden (Art. 33(3) PCT).

Die Merkmale der abhängigen Ansprüche 8,9,18-21 sind neu, trotzdem können sie nicht als erfinderisch angesehen werden, da sie innerhalb der üblichen Praxis des Fachmanns ohne die Ausübung jeder erfinderischen Aktivität scheinen zu sein.

Die Verfahren gemäß der Ansprüche 22-26 können als erfinderisch angesehen werden, da nirgends im Stand der Technik ein solches Rezyklisierungsverfahren nahegelegt ist.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Anspruch 1 entspricht nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In dem Anspruch wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben. Zur Beseitigung dieses Mangels erscheint es erforderlich, die für die Erzielung dieses Ergebnisses notwendigen technischen Merkmale in den Anspruch aufzunehmen, z.B. die **Salzkonzentration**, bei denen Albumin- und Ig-Fractionen eluiert werden.

Außerdem erfüllt der Gegenstand des Anspruchs 1 nicht das Erfordernis des Artikels 6 PCT, weil unklar ist, ob die Worte in Klammern **limitieren oder nicht**.

2. Der in dem Anspruch 8 benutzte Begriff "PPSB-Komplexe" hat keine allgemein anerkannte Bedeutung und läßt den Leser über die Bedeutung des betreffenden technischen Merkmals im Ungewissen. Dies hat zur Folge, daß die Definition des Gegenstands dieses Anspruchs nicht klar ist (Artikel 6 PCT), weil ihre Bedeutung (siehe S. 9, Z. 24) in dem Anspruch 8 nicht angegeben wird.

Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie muß das Plasma auf eine definierte, niedrige Ionenstärke eingestellt werden. Dies kann durch Verdünnen oder durch Umpufferung erreicht werden.

Hierbei entstehen große Volumina, die im technischen Maßstab die Menge des zu prozessierenden Plasmas limitieren. Darüber hinaus muß durch einen zusätzlichen Schritt vor der Chromatographie das im Humanplasma enthaltene Fibrinogen entfernt werden, um ein Verblocken der Säule zu verhindern.

S. Coheen et al. beschreiben in J. of Chromatography, 326 (1985), 235-241 ein Verfahren zur Fraktionierung von Humanserum. Dabei wird eine Bio-Gel TSK Phenyl-5PW-Säule mit der Ausgangslösung bestückt und anschließend bei 0°C mittels eines linearen Ammoniumsulfat-salzgradienten in 0,1 M Natriumphosphatpuffer eluiert. Eine solche lineare Eluierung kann nur im analytischen Maßstab vorgenommen werden, da ansonsten bei Auftragen der Ausgangslösung und Anwendung der genannten Anfangskonzentration von 1,7 M die Säule verstopfen würde, wenn man im präparativen Maßstab arbeiten würde. Darüberhinaus muß bei 0°C gearbeitet werden, um die Auflösung des Chromatogramms zu verbessern. Eine solche Verfahrensweise ist auf einen Prozess im präparativen Umfang wegen des technischen Aufwands nicht übertragbar.

Z. Hrkal et al, J. of Chromatographie, 242, 1982, Seite 385- 388, beschreiben eine Verfahren zur Fraktionierung von Plasma- Proteinen, wobei eine durch Rivanolfällung von Albumin befreite Fraktion mittels eines linearen Ammoniumsulfat- Gradienten aufgetrennt wird.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein im technischen Maßstab wirtschaftlich durchführbares Verfahren zur Fraktionierung von Plasma, insbesondere Humanplasma, oder Serum, insbesondere Humanserum, bereitzustellen, das in hohen Ausbeuten native, unmodifizierte Plasmaproteine liefert. Hierbei sollte ein Präzipitieren und Auflösen von therapeutisch relevanten Proteinen überwiegend vermieden werden und der Prozess bei Raumtemperatur ablaufen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man das Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs, bevorzugt ein von Gerinnungsfaktor VIII und/oder den Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes befreites Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs an einer hydrophoben Phase unter Anwendung eines stufenweisen Salzgradienten chromatographiert. Als Salz eignet sich insbesondere Ammoniumsulfat.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Hilfe der hydrophoben Interaktionschromatographie Plasma oder Serum in wenigstens eine Immunglobulin- und eine Albumin-

Patentansprüche

1. Verfahren zur präoperativen Fraktionierung von Plasma oder Serum, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Ausgangslösung, welche Plasma oder Serum enthält ohne Rivanolfällung einer hydrophoben Interaktions-chromatographie unterwirft und mit einem stufenweisen Salzgradienten (wenigstens) eine Immunglobulin- und eine Albumin-haltige Fraktion erhält.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein Plasma oder ein Serum humanen oder tierischen Ursprungs verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie mit einem Ammoniumsulfatsalzgradienten erfolgt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie bei hoher Ammoniumsulfatkonzentration beginnt und diese im nächsten Fraktionsschritt abgesenkt wird.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0,6 und <1,4 Mol/l und die niedrige Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0 und 0,4 Mol/l beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,7 bis 1 Mol/l beträgt und abgesenkt wird auf 0 bis 0,3 Mol/l.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausgangslösung und die Chromatographie-Phase bei Beginn der Trennung auf die gewünschte hohe Salzgradientenkonzentration eingestellt wird.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial Plasma eingesetzt wird, aus welchem die Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes in an sich bekannter Weise abgetrennt wurden.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß vom Ausgangsmaterial Gerinnungsfaktor VIII in an sich bekannter Weise abgetrennt wird und dieses Ausgangsmaterial zur präoperativen Fraktionierung eingesetzt wird.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial polyvalentes Humanplasma verwendet.
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial bezüglich viraler, bakterieller oder gegen zelluläre Antigene gerichtete Antikörper selektiertes Humanplasma verwendet.
12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß nach der gewonnenen ersten Fraktion mittels Stufengradienten zwei weitere Fraktionen gewonnen werden.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung nach der ersten Fraktion mit einem Ammoniumsulfatpuffer einer Konzentration von 0,4 bis 0,1 Mol/l beginnt und danach abgesenkt wird auf $< 0,1$ bis 0 Mol/l.
14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl- oder Alkyl-substituierte Phasen auf der Basis von Copolymeren aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat, Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol oder mit Dextran oder Polymeren gecoatete Kieselgele verwendet werden.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl-substituierte Copolymere aus Glycidylmethacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat verwendet wird.
16. Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,8 bis 1,0 Mol/l und die abgesenkte Ammoniumsulfatkonzentration 0,3 bis 0 Mol/l beträgt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Fraktion bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 Mol/l gewonnen wird und danach ein

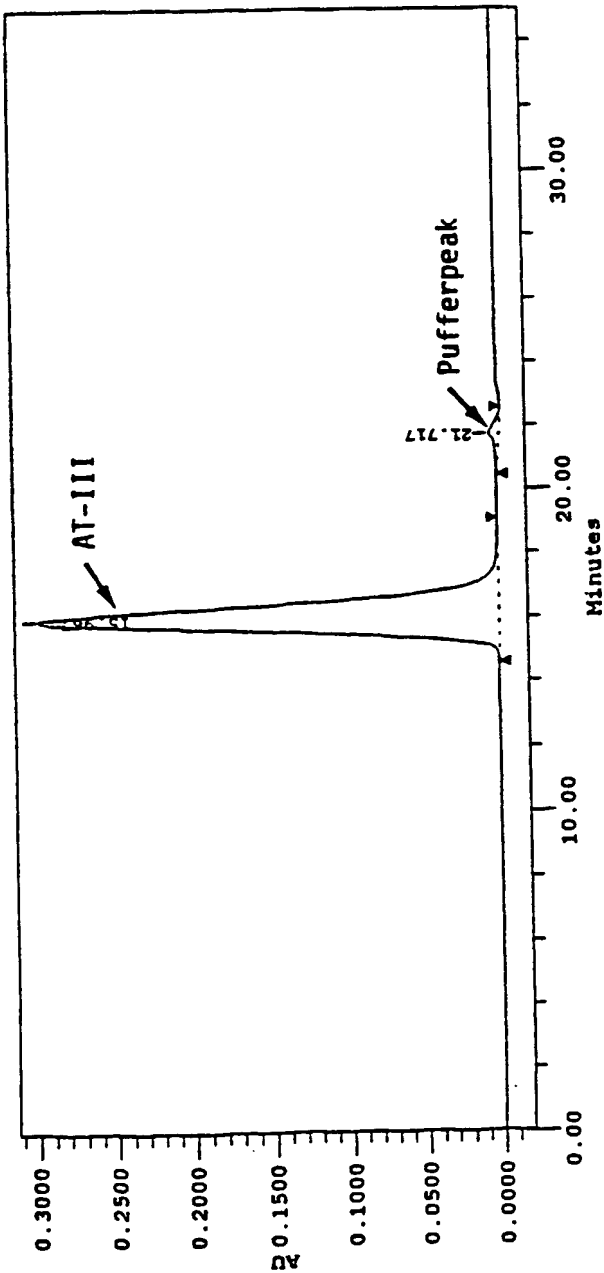
Stufengradient angewendet wird, wobei die Ammoniumsulfatkonzentration zunächst 0,3 Mol/l beträgt, und sodann auf 0 Mol/l abgesenkt wird.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene erste Fraktion durch Affinitätschromatographie sowie nachfolgende Anionenaustauscherchromatographie und Virusinaktivierung sowie übliche Filtrations-, Konzentrations- und Sterilisierungsschritte aufgearbeitet wird.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch einsetzbares Immunglobulin, insbesondere IgG gewinnt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion durch Anionenaustauscherchromatographie, Virusinaktivierung, Oktansäurebehandlung sowie Kationenaustauscherchromatographie und übliche Filtrations-, Sterilisations- und Konzentrierungsschritte zu einem verträglichen Immunglobulin G Präparat aufarbeitet.
22. Rezyklisierungsverfahren zur Fraktionierung von Plasma oder Serum gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß eine Plasma oder Serum enthaltende Ausgangslösung in präoperativem Maßstab ohne anfängliche Rivanolfällung mit einem stufenweise Salzgradienten mit einer hydrophoben Interaktionschromatographie chromatographiert und dabei wenigstens eine Immunglobulin- und eine Albumin- haltige Fraktion gewinnt und sodann das Permeat aus der ersten erhaltenen Albumin- Fraktion kontinuierlich dem Ammoniumsulfatpuffer-Vorratsbehälter mit der Pufferlösung 1 mit einer Ammoniumsulfatkonzentration der ersten hohen Stufe zuführt, die gewonnene erste Fraktion kontinuierlich sammelt, die zweite Immunglobulin- haltige Fraktion durch Herstellen eines Mischpuffers aus der Pufferlösung 1 und einer Ammoniumsulfat-freien Pufferlösung 2 oder alleinigen Einsatz des Puffers 2 mit der niedrigen Ammoniumsulfatkonzentration der 2. Stufe eluiert und kontinuierlich entfernt.

23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Eluierung der ersten Fraktion die Chromatographiesäule mit einem Stufengradienten behandelt und so eine zweite und dritte Fraktion erhält.
24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man nach je einem Rezyklisierungskreislauf die Interaktionschromatographiephase mit Natronlauge aus einem Vorratsbehälter 3 behandelt.
25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.
26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Immunglobulin, insbesondere IgG, gewinnt.
27. Verwendung eines Immunglobulinpräparates oder eines Antithrombin III-, Albumin- oder Transferrin-Präparates, erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 zur Herstellung eines Medikamentes für die therapeutische Anwendung.

Abbildung 6

HPSE-Chromatogramm einer gemäß Beispiel 9
hergestellten Antithrombin (AT-III) Lösung



Ergebnis :

#	Ret Time (min)	Area (uV*sec)	i Area	Name
1	15.967	16341442	98.35	
2	21.717	274934	1.65	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05827

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K1/20 C07K14/765 C07K16/06 C07K14/81 C07K14/79

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HRKAL Z ET AL: "HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF SERUM PROTEINS ON PHENYL SEPHAROSE CL-4B" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 242, Nr. 2, 1982, Seiten 385-388, XP000946223	1-21
Y	ISSN: 0021-9673 Seite 385, Absatz 3; Abbildungen 1-3; Tabelle I --- -/-	18-21, 27-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. September 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/10/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung ... die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05827

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5429746 A	04-07-1995	AU 689552 B	02-04-1998
		AU 1843395 A	04-09-1995
		BR 9507100 A	16-09-1997
		CA 2183888 A	24-08-1995
		CN 1146730 A	02-04-1997
		CZ 9602481 A	16-04-1997
		EP 0746398 A	11-12-1996
		HU 74845 A, B	28-02-1997
		JP 9509658 T	30-09-1997
		NO 963475 A	21-10-1996
		NZ 281480 A	26-06-1998
		WO 9522389 A	24-08-1995
		ZA 9501372 A	24-10-1995
EP 0339919 A	02-11-1989	JP 1275600 A	06-11-1989
		JP 2729484 B	18-03-1998
		JP 2004717 A	09-01-1990
		JP 2678249 B	17-11-1997
		DE 68925918 D	18-04-1996
		DE 68925918 T	02-10-1996
		EP 0682949 A	22-11-1995
		ES 2084599 T	16-05-1996
		KR 139049 B	30-04-1998
EP 0717049 A	19-06-1996	IT FI930260 A	16-06-1995
		AT 164594 T	15-04-1998
		DE 69409390 D	07-05-1998
		DE 69409390 T	29-10-1998
		ES 2117197 T	01-08-1998

Translation

PATENT COÖPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference Biotest 29 113	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/05827	International filing date (day/month/year) 23 June 2000 (23.06.00)	Priority date (day/month/year) 14 July 1999 (14.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 1/20, 14/765, 16/06, 14/81, 14/79		
Applicant BIOTEST PHARMA GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of <u>6</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 December 2000 (12.12.00)	Date of completion of this report 17 October 2001 (17.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05827

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☒ the description:

pages 1-3,5-26, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages 4,4a, filed with the letter of 18 July 2001 (18.07.2001)

☒ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages 1-27, filed with the letter of 18 July 2001 (18.07.2001)

☒ the drawings:

pages 1/6-6/6, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____

☒ the claims, Nos. 28,29

☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05827

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 27

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 27

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/05827

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 00/05827

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-26	YES
	Claims	27	NO
Inventive step (IS)	Claims	22-26	YES
	Claims	1-21	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

- D1: HRKAL, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Vol. 242, 1982, pages 385-388
- D2: US-A-5 429 746
- D3: EP-A-0 339 919
- D4: EP-A-0 717 049
- D5: GOHEEN, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Vol. 326, 1985, pages 235-241
- D6: SZEPESZ, LC-GC INTERNATIONAL (LIQUID AND GAS CHROMATOGRAPHY), Vol. 5, 1992, pages 24-29.

2. The present application describes a method for the preparative fractionating of plasma or serum, characterised in that when a starting solution containing plasma or serum is subjected to hydrophobic interaction chromatography without rivanol precipitation, one fraction is obtained containing immunoglobulin and one containing albumin, with a stepwise salt gradient.

3.1 Since D1 to D5 disclose linear gradients, the subject matter of Claims 1-26 is novel over D1 to D5 (PCT Article 33(2)).

3.2 The use disclosed in Claim 27 is not novel (PCT Article 33(2)). Immunoglobulin, antithrombin III, albumin or transferrin preparations are already known - see, for example, D2, column 5, second paragraph; D3, page 2, lines 21-22. The immunoglobulin, antithrombin III, albumin or transferrin produced using the present method is no different from other immunoglobulin, antithrombin III, albumin or transferrin produced using the known method.

4. D5, the closest prior art, discloses a method for fractionating human serum without rivanol precipitation by means of a linear ammonium sulphate salt gradient using hydrophobic interaction chromatography (HIC), from which the subject matter of Claim 1 differs in that the salt gradient is implemented "stepwise".

In view of said prior art, the technical problem to be solved is that of finding an alternative method for plasma or serum fractionating.

The proposed solution is not considered to involve an inventive step for the following reasons (PCT Article 33(3)):

- a) linear methods for separating serum in albumin and immunoglobulin (Ig) fractions by means of HIC are already known - see D5, page 239, paragraph 3, lines 1-2.

/...

- b) It is also known that albumin and Igs are characterised by different hydrophobicities - see D5, page 239, paragraph 2, lines 4-5 and paragraph 3, lines 1-2; in other words, albumin and Igs are eluted at two **distinctly separated** salt concentrations. It can be derived from D5 that albumin is eluted with approximately 0.85M ammonium sulphate and Ig with approximately 0.25M ammonium sulphate.
- c) Thus, for the person skilled in the art wishing to separate albumin and Igs and being aware of points 4 a) and b) above, it would be **obvious** to change stepwise from a salt concentration in which albumin is eluted to a salt concentration in which Ig is eluted, i.e. from approximately 0.85M to approximately 0.25M - see D5, Figures 1 and 5.
- d) Since compounds that can be separated in an analytic column can also be separated in a preparative column, said feature ("preparative") cannot be considered inventive. Optimisation of the conditions in a preparative column is **common practice** for the person skilled in the art who knows the conditions in an analytic column.
- e) The methods according to D5 are implemented at 0°C because of the stability of the serum constituents and not only because of the rather better resolution of the chromatogram - see D5, page 236, paragraph 5 and page 239, paragraph 2.

/...

f) It is not surprising that greater quantities of starting material can be processed in a chromatography cycle than in D5, since the **columns** used are **larger**.

Therefore the subject matter of Claims 1-7 and 10-17 does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

The features of the dependent Claims 8, 9 and 18-21 are novel but cannot be considered inventive, since they appear to lie within the scope of what would be straightforward for the person skilled in the art, requiring no inventive input.

The methods according to Claims 22-26 can be considered to involve an inventive step since such a recycling method cannot be derived from the prior art.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/05827

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The report relating to Claim 27 was established on the basis of the indicated effects of the compound /composition - see ISA 210.
2. The amendments submitted with the letter of 18 July 2001 satisfy the requirements of PCT Article 34(2)(b).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/05827

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.1

1. The report relating to Claim 27 was established solely on the basis of the indicated effects of the compound/composition - see ISA 210.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/05827

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV.2 and .4

The production and the preparations of known compounds do not constitute a single general inventive concept (PCT Rule 13.1).

In consequence, the different inventions or groups of inventions are:

- I Claims 1-26: Method for preparative fractionating of plasma or serum.
- II Claim 27: Use of an immunoglobulin preparation or of an antithrombin III, albumin or transferrin for the manufacture of a pharmaceutical product.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 1 does not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. Said claim attempts to define its subject matter in terms of the result to be achieved, and in so doing merely states the problem to be solved. To redress this defect, it appears that those technical features which are essential in order to achieve said result, for example the **salt concentration** at which albumin and Ig fractions are eluted, should be included in the claim.

Furthermore, the subject matter of Claim 1 does not meet the requirement of PCT Article 6 because it is unclear whether the words between parentheses **are restrictive or not**.

2. In Claim 8, the term "PPSB complexes" has no generally recognised meaning and leaves the reader unclear as to the relevant technical feature. In consequence, the definition of the subject matter of said claim lacks clarity (PCT Article 6) since its meaning - see page 9, line 24 - is not given in Claim 8.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWES

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BEIL, Hans C.
HANSMANN & VOGESER
Postfach 80 01 40
D-65901 Frankfurt am Main
ALLEMAGNE

Eingegangen

18. Okt. 2001

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

17.10.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
Biotest 29 113

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/05827

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
23/06/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
14/07/1999

Anmelder

BIOTEST PHARMA GMBH et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde

Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Zoglauer, H

Tel. +49 89 2399-8051



Express Mail Deposit date: January 11, 2002
Express Mail Label No: EV015940662 US

**CONVENTION CONCERNING INTERNATIONAL COLLABORATION
IN THE FIELD OF PATENTS**

Sender: THE AUTHORITIES ENTRUSTED WITH THE
PROVISIONAL INTERNATIONAL EXAMINATION

To: Hans C. Beil HANSMANN & VORGESER P.O. Box 80 01 40 D-65901 Frankfurt am Main Germany		PCT COMMUNICATION CONCERNING THE FORWARDING OF THE PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE ACTION (Regulation 71.1 of the PCT)	
		Mailing Date: (month/date/year) 10-17-2001	
File No. of the Applicant or Attorney Biotest 29 113		IMPORTANT COMMUNICATION	
International File No.: PCT/EP00/05827	International Filing Date (Month/Day/Year) 6/23/2000	Priority Date (Month/Day/Year) 7/14/1999	
Applicant: BIOTEST PHARMA GMBH et al.			

1. The Applicant is informed that the authorities, entrusted with the Provisional International Examination, are forwarding to him herewith the Provisional International Office Action, if applicable together with the associated appendixes, which was prepared in connection with the International Application.
2. A copy of the Office Action, if applicable together with the associated appendixes, will be forwarded to the International Office in order to be sent to all the Offices selected.
3. At the request of a selected Office, the International Office will prepare a translation of the Office Action (but not of the appendixes) into English and forward it to this Office.

4. REMINDER

For entry into the National phase, the Applicant must undertake certain actions at each of the Offices selected within 30 months of the priority date (or even later in the case of some Offices) (submitting translations and paying national fees) (Article 39 (1)) (See also the information forwarded by the International Office in form PCT/IB/301)

If a translation of the International Application has to be forwarded to a selected Office, then this translation must also contain translations of all appendixes to the Provisional International Office Action. It is the responsibility of the Applicant to have such translations prepared and to pass them on directly to the selected Offices in question.

Further details concerning the relevant deadlines and requirements of the Offices selected are given in Volume II of the PCT manual for applicants.

Name and address of the authorities entrusted with the Provisional International Examination European Patent Office D-80298 Munich	Authorized Employee H. Zoglauer
---	---

CONVENTION CONCERNING INTERNATIONAL COLLABORATION IN THE FIELD OF PATENTS

PCT

PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE ACTION

(Article 36 and Regulation 70 of the PCT)

File No. of the Applicant or Attorney Biotest 29 113	FURTHER PROCEDURE	see communication concerning the mailing of the provisional Office Action (Form PCT/IPEA/416)
International File No.: PCT/EP00/05827	International Filing Date (Month/Day/Year) 6/23/2000	Priority Date (Month/Day/Year) 7/14/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K1/20		
Applicant BIOTEST PHARMA GMBH et al.		

1.	The Provisional International Office Action was prepared by the Authorities entrusted with the Provisional International Examination.																								
2.	<p>This REPORT comprises a total of 9 pages, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Moreover, APPENDIXES are enclosed with the Office Action; these are pages with specifications, claims and drawings, which were changed and on which this report is based, and/or pages with corrections made (see Regulation 70.16 and Section 607 of the PCT administrative guidelines)</p> <p>These appendixes comprise a total of 6 pages.</p>																								
3.	<p>This report contains information and the pages corresponding to the following items:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 5%;">I</td> <td style="width: 5%;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="width: 90%;">Basis for the report</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>An expert opinion concerning the novelty, inventive activity and commercial applicability has not been prepared</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Lack of uniformity of the invention</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Justified determination according to Article 35(2) with respect to the novelty, the inventive activity and commercial applicability; documents and declarations in support of this determination</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Particular documents listed</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td>Particular deficiencies in the International Application</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Particular comments concerning the International Application</td> </tr> </table>	I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis for the report	II	<input type="checkbox"/>	Priority	III	<input checked="" type="checkbox"/>	An expert opinion concerning the novelty, inventive activity and commercial applicability has not been prepared	IV	<input checked="" type="checkbox"/>	Lack of uniformity of the invention	V	<input checked="" type="checkbox"/>	Justified determination according to Article 35(2) with respect to the novelty, the inventive activity and commercial applicability; documents and declarations in support of this determination	VI	<input type="checkbox"/>	Particular documents listed	VII	<input type="checkbox"/>	Particular deficiencies in the International Application	VIII	<input checked="" type="checkbox"/>	Particular comments concerning the International Application
I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis for the report																							
II	<input type="checkbox"/>	Priority																							
III	<input checked="" type="checkbox"/>	An expert opinion concerning the novelty, inventive activity and commercial applicability has not been prepared																							
IV	<input checked="" type="checkbox"/>	Lack of uniformity of the invention																							
V	<input checked="" type="checkbox"/>	Justified determination according to Article 35(2) with respect to the novelty, the inventive activity and commercial applicability; documents and declarations in support of this determination																							
VI	<input type="checkbox"/>	Particular documents listed																							
VII	<input type="checkbox"/>	Particular deficiencies in the International Application																							
VIII	<input checked="" type="checkbox"/>	Particular comments concerning the International Application																							

Date on which Application was filed 12/12/2000	Date on which this report was prepared 10/17/2001
Name and address of the authorities entrusted with the Provisional International Examination European Patent Office D-80298 Munich	Authorized Employee F. Lopez Garcia

I. Basis for the Report

1. This report was drawn up on the basis (*substitute pages, which were presented to the Patent Office upon request according to Article 14, are regarded within the scope of this report as "having been submitted originally" and are not enclosed with it, because they do not contain any changes*) of:

Specification, pages:

1 - 3, 5 - 26

Original version

4, 4a
7/18/2001

Received on

7/19/2001 with letter of

Claims, No.:

1 - 27

Received on

7/19/2001 with letter of 7/18/2001

Drawings, pages:

1/6 - 6/6

Original version

2. With regard to language: All constituent parts, named above, were available to the authorities in the language, in which the international application was filed or were submitted in this language, unless it is stated differently here.

The constituent parts were available to the Authorities in the language or were submitted in this language, which is

- ☐ the language of the translation, which was submitted for the international search (according to Regulation 23.1(b)),
- ☐ the language, in which the international application was published (according to Regulation 48.3(b)),
- ☐ the language of the translation, which was submitted for the provisional international examination (according to Regulation 55.2 and 55.3),

3. With regard to the nucleotide sequence and/or the amino acid sequence, disclosed in the international application, the provisional international examination has been carried out on the basis of the sequence protocol, which

- ☐ is contained in written form in the international application.
- ☐ is submitted in computer-readable form together with the international application.
- ☐ is submitted subsequently to the authorities subsequently in written form.
- ☐ is submitted subsequently to the authorities in computer-readable form.
- ☐ the declaration, that the written sequence protocol does not go beyond the disclosure content of the international application at the time of the application, was presented.
- ☐ the declaration, that the information in the computer-readable form corresponds to the written sequence protocol, was presented

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION**

4. Because of the changes, the following documents have been omitted

<input type="checkbox"/>	specification	pages:
<input checked="" type="checkbox"/>	claims	No.: 28, 29
<input type="checkbox"/>	drawings	page:

5. ☐ This report has been prepared without taking (any of) the changes into consideration, since these, in the opinion of the authorities, for the reasons given, go beyond the disclosure content of the originally submitted version (Regulation 70.2(c)).

(Item 1 should refer to substitute pages, which contain such changes; they are to be enclosed with this report.

6. Any additional comments
see supplementary pate

III. An expert opinion concerning the novelty, inventive activity and commercial applicability has not been prepared

1. The following parts of the application were not examined with regard to whether the claimed invention is to be regarded as novel, based on inventive activity (not obviously) and commercially applicable.

<input type="checkbox"/>	The whole of the International Application
<input checked="" type="checkbox"/>	Claims 27 (partly)

Justification:

<input type="checkbox"/>	The whole of the International Application or the above-mentioned claims Nos. relate to the object below, for which a Provisional International Examination need not be carried out (<i>precise details</i>):
<input type="checkbox"/>	The specification, claims or drawings (please give details below) or the above-named claims Nos. are so unclear, that a meaningful expert opinion could not be prepared (<i>precise details</i>).
<input type="checkbox"/>	The claims or the claims Nos. named above are supported inadequately by the specification, so that a meaningful expert opinion cannot be prepared.
<input checked="" type="checkbox"/>	No International Search Report was prepared for the claims 27 (not checked in this report).

2. A meaningful provisional international examination cannot be carried out, because the protocol of the nucleotide sequences and the amino acid sequences does not correspond to the standard prescribed in Appendix C of the Administrative Regulations:

<input type="checkbox"/>	The written form was not submitted or does not correspond to the standard.
--------------------------	--

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION**

☐ The computer-readable form was not submitted or does not correspond to the standard.

IV. Deficient Uniformity of the Invention

1. In response to the request to limit the claims or to pay additional fees, the Applicant has

- ☐ limited the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither limited the claims nor paid additional fees.

2. ☒ The authorities have noted that the requirement, that the invention be uniform, is not fulfilled and, in accordance with Regulation 68.1, has requested the Applicant not to limit the claims or to pay additional fees

3. The authorities are of the opinion that the requirement of Regulations 13.1, 13.2 and 13.3, that the invention be uniform,

- ☐ is fulfilled
- ☐ is not fulfilled for the following reasons:

4. Therefore, for preparing this report, a Provisional International Examination of the following parts of the International Application was carried out:

- ☒ all parts
- ☐ the parts, which relate to claims v

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION**

International File Number
PCT/EP00/05827

V. Justified determination according to Article 35(2) with respect to the novelty, the inventive activity and the commercial applicability; documents and explanations in support of this determination

1. Determination

Novelty	Yes: Claims	1 – 28
	No: Claims	27
Inventive Activity	Yes: Claims	22 – 28
	No: Claims	1 - 21
Industrial Applicability	Yes: Claims	1 – 27
	No: Claims	

2. Documents and Explanations

see supplementary sheet

VIII. Certain Comments Concerning the International Application

The following is noted concerning the clarity of the claims, the specification and the drawings concerning the question whether the claims are supported to the full extent in the specification

see supplementary sheet

Regarding Item I

Basis for the Report

1. The report of claim 27 was carried out with respect to the listed effects of the compound / composition (see ISA 210)
2. The changes, submitted with the letter of 7-18-01, fulfill the requirements of Article 34 (2) b) of the PCT.

Regarding Item III

An Expert Opinion Concerning the Novelty, Inventive Activity And Industrial Applicability Was Not Prepared

1. The report of claim 27 was carried out only with respect to the listed effects of the compound / composition (see ISA 210).

Regarding Item IV

Deficient Uniformity of the Invention

The production and preparations of known compounds do not realize a single, general, inventive idea (Regulation 13.1 of the PCT).

The different inventions / groups of invention therefore are:

- I. Claims 1 - 26: Method For The Preparative Fractionation Of Plasma Or Serum.
- II. Claim 27: use of an immunoglobulin preparation or an antithrombin III, albumin or transferrin for the preparation of a medicinal drug.

Regarding Item V

Justified determination according to Article 66.2(a)(ii) with respect to the novelty, the inventive activity and the commercial applicability; documents and explanations in support of this determination

1. Reference is made to the following documents:

D1: HRKAL JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 242, 1982, pp. 385 -
386
D2: US patent 5,429,746
D3: EP-A-0 339 919
D4: EP-A-0 717 049
D5: GOHEEN JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 326, 1985, pp. 235
- 241
D6: SZEPESZ LC-GC INTERNATIONALA (LIQUID AND GAS
CHROMATOGRAPHY), 5, 1992, pp. 24 – 29

2. The present application describes a method for the preparative fractionation of plasma or serum, wherein a starting solution, which contains plasma or serum, is subjected without rivanol precipitation to a hydrophobic interaction chromatography and an immunoglobulin-containing fraction and an albumin-containing fraction are obtained with a stepwise salt gradient.

3.1: Since documents D1 – D5 disclose linear gradients, the object of claims 1 - 26 is new relative to D1 – D5 (Art. 33(2) of the PCT).

3.2 The use of claim 27 is not new (Art. 33(2) of the PCT). Immunoglobulin, antithrombin III, albumin or transferrin preparations are already known (for example, D2, column 5, second paragraph; D3, page 2 lines 21 – 22).

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION – SUPPLEMENTARY PAGE**

Immunoglobulin, antithrombin III, albumin and transferrin, prepared with the present method, do not differ from other immunoglobulin, antithrombin III, albumin and transferrin, which are prepared with known methods.

4. Documents D5, which is regarded as the closest state of the art, discloses a method for the fractionation of human serum without rivanol precipitation by means of a linear ammonium sulfate salt gradient by a hydrophobic interaction chromatography (HIC), from which the object of claim 1 differs owing to the fact that the salt gradient is carried out "stepwise".

In view of this state of the art, the technical problem, which is to be solved, is to find an alternative method for fractionating plasma or serum.

The proposed solution is not regarded as inventive for the following reasons (Art. 33(2) of the PCT):

- a) Linear methods of separating serum in albumin and Igs fractions by means of HIC are already known (see D5, page 239, paragraph 3, I. 1 - 2).
- b) It is also known that the hydrophobicity of albumin and Igs are different (see D5, page 239, paragraph 2 I. 4 - 5 and paragraph 3, I. 1 - 2), that is, albumin and Igs are eluted with 2 **definitive, separate** salt concentrations. It can also be seen from D5 that the albumin is eluted with approximately 0.85M ammonium sulfate and Ig with approximately 0.25M ammonium sulfate.
- c) It seems obvious for someone skilled in the art, who wishes to separate albumin and Igs and knows items a) and b), to change stepwise from a salt concentration, at which albumin is eluted, to a salt concentration, at which the Ig is eluted, that is, from about 0.85M ammonium sulfate to about 0.25M ammonium sulfate (see D5, Figures 1 and 5).

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION – SUPPLEMENTARY PAGE**

d. Since compounds, which can be separated on an analytical column, can also be separated on a preparative column, this distinguishing feature ("preparative") cannot be regarded as inventive. The optimization of the conditions of a preparative column is a customary exercise for someone skilled in the art, as soon as the conditions for an analytical column are known.

e) The methods of D5 are carried out at 0°C because of the stability of the serum components and not because of the somewhat better resolution of the chromatogram (see D5, page 236, paragraph 5 and page 239, paragraph 2).

f) That larger amounts of starting material can be processed than in the case of D5 is not surprising, because larger column are used

The object of claims 1 - 7 and 10 - 17 can therefore not be regarded as inventive (Art. 33(2) of the PCT).

The distinguishing features of the dependent claims 8, 9, 18 - 21 are new. Nevertheless, they cannot be regarded as inventive, since they appear to be within the scope of the usual activities of someone skilled in the art and do not require any inventive activity to be exercised.

The methods of claims 22 - 26 can be regarded as inventive since such a recycling method is not suggested anywhere in the state of the art.

Regarding Item VIII

Certain Comments Concerning The International Application

1. Claim 1 does not meet the requirements of Article 6 of the PCT, because the object of the application for protection is not define clearly. In the claim, an attempt is

**PROVISIONAL INTERNATIONAL OFFICE
ACTION – SUPPLEMENTARY PAGE**

made to define the object by the result, which is to be achieved; with that, however, only the objective, which is to be accomplished, is stated. To eliminate this deficiency, it appears to be necessary to take up the technical distinguishing features, necessary for achieving this result, such as the salt concentration, at which the albumin and Ig fractions are eluted, in the claim.

In addition, the object of claim 1 does not fulfilled the requirement of Article 6 of the PCT, because it is not clear whether the words in parenthesis are or are not limiting.

2. The concept of "PPSB, complexes", used in claim 8, does not have a generally recognized meaning and leaves the reader uncertain concerning the significance of the technical distinguishing feature in question. As a result, the definition of the object of this claim is not clear (Article 6 of the PCT), because its meaning (see p. 9, line 24) is not given in claim 8.

Claims

1. A method for fractionating plasma or serum, wherein a starting solution, containing plasma or serum, is subjected to a hydrophobic interaction chromatography without rivanol precipitation and, by using a stepwise salt gradient, (at least) one immunoglobulin-containing fraction and one albumin-containing fraction are obtained.

2. The method of claim 1, wherein a plasma or serum of human or animal origin is used as starting material.

3. The method of claims 1 or 2, wherein an ammonium sulfate gradient is used for the chromatography.

4. The method of claim 3, wherein the chromatography commences at a high concentration of ammonium sulfate, which is lowered in the next step of the fractionation.

5. The method of one of the claims 3 or 4, wherein the high concentration of ammonium sulfate is between 0.6 and not more than 1.4 moles/L and the low ammonium concentration is between 0 and 0.4 moles/L.

6. The method of one of the claims 3 to 5, wherein the high concentration of ammonium sulfate buffer is 0.7 to 1 moles/L, which is lowered to 0 to 0.3 moles/L.

7. The method of one of the claims 1 to 6, wherein the starting solution and the chromatography phase are adjusted to the desired high salt gradient concentration at the start of the fractionation.

8. The method of one of the claims 1 to 7, wherein plasma, from which the clotting factors of the PPSB complex were removed by a known procedure, is used as starting material.

9. The method of one of the claims 1 to 8, wherein clotting factor VIII is removed from the starting material by a known procedure, and this starting material is used for the preparative fractionation.

10. The method of one of the claims 2 to 9, wherein polyvalent human plasma is used as a starting material.

11. The method of one of the claims 2 to 9, wherein selected human plasma, selected with respect to viral, bacterial or antibodies, directed against cellular antigens, is used as starting material.

12. The method of one of the claims 1 to 11, wherein, after the first fraction, two further fractions are obtained by means of step gradients.

13. The method of claim 12, wherein, after the first fraction, the fractionation commences with an ammonium sulfate buffer having a concentration of 0.4 to 0.1 moles/L, which is then lowered to less than 0.1 to 0 moles/L.

14. The method of one of the claims 1 to 13, wherein phenyl-substituted or alkyl-substituted phases, based on copolymers of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate, copolymers of polystyrene or divinylbenzene or silica, coated with dextran or polymers, are used as hydrophobic interaction phase.

15. The method of claim 14, wherein copolymers of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate are used as hydrophobic interaction phase.

16. The method of claims 14 or 15, wherein the high concentration of ammonium sulfate buffer is 0.8 to 1.0 moles/L and the lowered concentration of ammonium sulfate is 0.3 to 0 moles/L.

17. The method of claim 16, wherein the first fraction is obtained at an ammonium sulfate concentration of 0.9 moles/L and, after that, a step gradient is

employed, the ammonium sulfate concentration initially being 0.3 moles/L and then lowered to 0 moles/L.

18. The method of one of the claims 1 to 17, wherein the first fraction obtained is worked up in a known manner and therapeutically usable antithrombin III, transferrin and/or albumin are obtained.

19. The method of claim 18, wherein the first fraction obtained is worked up by affinity chromatography followed by anion exchange chromatography and virus inactivation as well as the usual filtering, concentrating and sterilizing steps.

20. The method of one of the claims 1 to 18, wherein the second fraction obtained is worked up in a known manner and therapeutically usable immunoglobulin, especially IgG, is obtained.

21. The method of claim 20, wherein the second fraction obtained is worked up by anion exchanger chromatography, virus inactivation, octanoic acid treatment, as well as cation exchanger chromatography and the usual filtering, sterilizing and concentrating steps into a compatible immunoglobulin G preparation.

22. A recycling method for fractionating plasma or serum of one of the claims 1 to 16, wherein a starting solution, containing plasma or serum, is chromatographed on a preparative scale without initial rivanol precipitation with a stepwise salt gradient with hydrophobic interaction chromatography and, by such a procedure, at least one immunoglobulin-containing fraction and one albumin-containing fraction are obtained and the permeate is then supplied from the first albumin fraction obtained continuously to the ammonium sulfate buffer reservoir with the buffer solution 1 with an ammonium sulfate concentration of the first high step, the first fraction obtained is collected continuously, the second immunoglobulin-containing-fraction is eluted by preparing a mixed buffer from the buffer solution 1 and an ammonium sulfate-free buffer solution 2 or by using only the buffer 2 with the low ammonium sulfate concentration of the 2nd step and removed continuously.

23. The method of claim 22, wherein, after the first fraction is eluted, the chromatographic column is treated with a step gradient and a second and third fraction are obtained in this manner.

24. The method of one of the claims 22 or 23, wherein, after each recycling cycle, the interaction chromatography phase is treated with sodium hydroxide solution from a reservoir 3.

25. The method of one of the claims 22 to 24, wherein the first fraction obtained is worked up in a known manner and therapeutically usable antithrombin III, transferrin and/or albumin are obtained.

26. The method of one of the claims 22 to 24, wherein the second fraction obtained is worked up in a known manner and therapeutically usable immunoglobulin, especially IgG, is obtained.

27. The use of an immunoglobulin preparation or an antithrombin III, albumin or transferrin preparation, obtained according to the method of one the claims 1 to 26, for therapeutic application.

5

10

**Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma oder Serum, so
erhaltene Präparate und deren Verwendung**

Die Erfindung betrifft das in den Ansprüchen beschriebene Verfahren zur chromatographischen Fraktionierung von Plasma oder Serum, insbesondere Humanplasma/-Serum an einer hydrophoben Interaktionsphase mittels eines stufenweisen Salzgradienten sowie die daraus hergestellten Proteinpräparate und deren Verwendung.

Erste Versuche zur industriellen Fraktionierung von Humanplasma wurden schon in den 40iger Jahren durchgeführt. Die hierbei angewandte Methode basiert auf der Fällung von Proteinfractionen mittels Alkohol, wobei durch Variation von pH, Ionenstärke, Temperatur und Alkoholkonzentration in diesen Fraktionen verschiedene Plasmaproteine in angereicherter Form erhalten werden.

25

Von besonderer Bedeutung für die therapeutische Anwendung sind die nach diesem Prozess gewonnenen Fraktionen, die Immunglobuline und Albumin enthalten. Eine Übersicht über o. g. Methoden ist den Übersichtsartikeln (J.E. More, M.J. Harvey, Blood Separation and Plasma Fractionation, Wiley-Liss, New York 1991, 261-306 und P. Kistler, H. Friedli, Methods of Plasma Protein Fractionation, Academic Press, London, 1980, 3-15) zu entnehmen.

30

Neben Alkohol werden auch andere Fällreagenzien, wie Ammoniumsulfat und Polyethylenglycol, zur Gewinnung von Plasmafraktionen eingesetzt (A.P. Phillips, K.L. Martin, W.H. Horton, The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: Yield and Purity of Antibody Activity, J. of Immunological Methods, 74 (1984) 385-393, A. Polson et al., The Fractionation of Protein Mixtures by Linear Polymers of High Molecular Weight, Biochem.

35

Biophys. Acta, 82 (1964) 463-475; P.D. Gorevic et. al., Methods in Enzymology, Vol. 116, 1985, 3-25; DE 2936047C2).

Prinzipiell weisen alle Fällmethoden zur Isolierung von Plasmaproteinen einige Nachteile auf.

- 5 Die zur Fällung eingesetzten Agentien bewirken eine partielle Denaturierung der separierten Proteine. Dies ist an der Bildung von Aggregaten und damit verbundenen Unverträglichkeiten bei der therapeutischen Anwendung zu erkennen. Um aus den so gewonnenen Proteinfraktionen verträgliche Präparate zu erhalten, sind weitere aufwendige Reinigungsschritte notwendig.

10

Ein weiterer Nachteil der Methoden besteht darin, dass Fällungsreaktionen, speziell bei so komplexen Gemischen wie Humanplasma, niemals quantitativ verlaufen. Dies und die zusätzlich notwendigen Reinigungsschritte führen zu beträchtlichen Ausbeuteverlusten.

- 15 Diese Verfahren stellen somit keine optimale Nutzung des wertvollen Ausgangsmaterials, insbesondere von Humanplasma oder Humanserum dar.

Aus diesem Grunde wurden Versuche unternommen, die Plasmafraktionierung mit schonenderen Methoden und höheren Ausbeuten durchzuführen. Hierzu bieten sich adsorptive Methoden an.

20

Spezielle Eigenschaften der Proteine, wie Ladung, Hydrophobizität, Größe und charakteristische Bindungseigenschaften werden dazu genutzt, um eine Bindung der Proteine an geeignete Liganden zu bewirken.

- 25 Besonders vorteilhaft ist es, wenn diese Liganden an einen wasserunlöslichen stationären Träger gebunden sind. Die Bindung der Proteine an den substituierten Träger kann im Batch- oder als säulenchromatographisches Verfahren durchgeführt werden, wobei sich die chromatographische Methode als besonders vorteilhaft erweist. Zur chromatographischen Isolierung von Plasmaproteinen wurden Anionen- und Kationenaustauscher, Affinitäts- und hydrophobe Phasen sowie ausschlußchromatographische Materialien eingesetzt.

30

Diese chromatographischen Methoden wurden bisher in erster Linie zur Feinreinigung von gefällten Plasmafraktionen verwendet.

- 35 Im Folgenden sind einige Beispiele aufgelistet.

In der EP 0447585B1 ist die Isolierung von Immunglobulin G aus Cohn Paste II beschrieben.

EP 0352500B1 beinhaltet die Herstellung von Immunglobulin M aus mit Alkohol präzipitierter Paste III.

5

Transferrin (DE 3733181C1), α_1 -Antitrypsin (EP 0717049A1, US 5,610,285) und Antithrombin III (EP 0844254A2) können mit Hilfe unterschiedlicher chromatographischer Methoden aus Cohn-Paste IV isoliert werden.

- 10 Cohn-Paste V dient als Ausgangsmaterial für die chromatographische Albumin-Herstellung (EP 0792887A1) sowie zur Aufreinigung von α_1 -saurem Glycoprotein (US 5,739,293).

Ebenso können alkoholhaltige Überstände der Cohn-Fraktionierung als Ausgangsmaterial für eine chromatographische Albumin-Herstellung eingesetzt werden (EP 0402205B1).

15

Eine Kombination von Alkoholfällung und Chromatographie zur Gewinnung von Plasmaproteinen ist in US 5,138,034 beschrieben.

- 20 Auch die direkte Gewinnung von Immunglobulin G und Albumin aus Humanplasma, ohne vorherige Fällung und Abtrennung eines Präzipitates, mittels Ionenaustauschchromatographie ist in DE 3640513C2 und WO 94/29334 beschrieben.

- 25 Eine Übersicht über die Anwendung chromatographischer Methoden zur Gewinnung von Proteinen aus Humanplasma findet sich in: J.M. Curling, Separation of Plasma Proteins, Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden, 1993.

- 30 Wie schon oben erwähnt, weisen alle beschriebenen Verfahren entscheidende Nachteile auf. So führen alle über Fällreaktionen gewonnenen Plasmaproteine zu erheblichen Ausbeuteverlusten und erfordern aufwendige zusätzliche Reinigungsschritte, um die therapeutische Anwendung zu ermöglichen. Außerdem ist ein großer technischer Aufwand zur Kühlung der Reaktionsgefäße, Zentrifugen oder Filter notwendig.

Die mittels Ionenaustauschchromatographie aus Plasma gewonnenen Produkte erfordern eine aufwendige Vorkonfektionierung des Humanplasmas.

Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie muß das Plasma auf eine definierte, niedrige Ionenstärke eingestellt werden. Dies kann durch Verdünnen oder durch Umpufferung erreicht werden.

- 5 Hierbei entstehen große Volumina, die im technischen Maßstab die Menge des zu prozessierenden Plasmas limitieren. Darüber hinaus muß durch einen zusätzlichen Schritt vor der Chromatographie das im Humanplasma enthaltene Fibrinogen entfernt werden, um ein Verblocken der Säule zu verhindern.
- 10 S. Coheen et al. beschreiben in J. of Chromatography, 326 (1985), 235-241 ein Verfahren zur Fraktionierung von Humanserum. Dabei wird eine Bio-Gel TSK Phenyl-5PW-Säule mit der Ausgangslösung bestückt und anschließend bei 0°C mittels eines linearen Ammoniumsulfat-salzgradienten in 0,1 M Natriumphosphatpuffer eluiert. Eine solche lineare Eluierung kann nur im analytischen Maßstab vorgenommen werden, da ansonsten bei Auftragen der
- 15 Ausgangslösung und Anwendung der genannten Anfangskonzentration von 1,7 M die Säule verstopfen würde, wenn man im präparativen Maßstab arbeiten würde. Darüberhinaus muß bei 0°C gearbeitet werden, um die Auflösung des Chromatogramms zu verbessern. Eine solche Verfahrensweise ist auf einen Prozess im präparativen Umfang wegen des technischen Aufwands nicht übertragbar.

20

- Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein im technischen Maßstab wirtschaftlich durchführbares Verfahren zur Fraktionierung von Plasma, insbesondere Humanplasma, oder Serum, insbesondere Humanserum, bereitzustellen, das in hohen Ausbeuten native, unmodifizierte Plasmaproteine liefert. Hierbei sollte ein Präzipitieren und Auflösen von
- 25 therapeutisch relevanten Proteinen überwiegend vermieden werden und der Prozess bei Raumtemperatur ablaufen.

- Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß man das Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs, bevorzugt ein von Gerinnungsfaktor VIII und/oder den
- 30 Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes befreites Plasma oder Serum, insbesondere humanen Ursprungs an einer hydrophoben Phase unter Anwendung eines stufenweisen Salzgradienten chromatographiert. Als Salz eignet sich insbesondere Ammoniumsulfat.

- Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Hilfe der hydrophoben Interaktions-
- 35 chromatographie Plasma oder Serum in wenigstens eine Immunglobulin- und eine Albumin-

haltige Fraktion im präparativen Maßstab getrennt werden kann, wobei die Chromatographie bei Raumtemperatur, ohne aufwendige Kühlvorrichtungen, durchgeführt werden kann.

Im folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren näher erläutert.

5

1. Fraktionierung

Erfindungsgemäß kann (Human-)Plasma oder (Human-)Serum verwendet werden, welches von Gerinnungsfaktoren befreit sein kann. Darüberhinaus kann auch tierisches Plasma oder
 10 Serum mit oder insbesondere ohne Gerinnungsfaktoren eingesetzt werden. Das Ausgangsmaterial kann sowohl von normalen Spenderpools als auch von ausgewählten (selektierten) Spendern mit hohen Antikörpertitern gegen virale, bakterielle oder zelluläre Antigene gewonnen werden. Bei selektiertem Ausgangsmaterial (Hyperimmunglobulin) wird bevorzugt solches mit hohen Titern gegen CMV, Hepathitis B, Varicella, Tetanus oder Anti-D
 15 gewählt.

Vorzugsweise wird als Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren ein von den o.g. Gerinnungsfaktoren befreites Plasma, insbesondere Humanplasma oder -serum eingesetzt. Die Abtrennung der wertvollen Gerinnungsfaktoren aus Plasma, die selbst von
 20 großem therapeutischen Nutzen sind, ist bekannt.

So wird beispielsweise das aus einem Auftauprozess gewonnene Kryopräzipitat als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Faktor VIII-Konzentrat verwendet und die Faktoren II, VII, IX und X (PPSB-Komplex) werden durch Adsorption an einen
 25 Anionenaustauscher isoliert und in gereinigter Form ebenfalls therapeutisch eingesetzt.

Zur Gewinnung des bevorzugten Ausgangsmaterials für das erfindungsgemäße Verfahren kann daher insbesondere ein nach den Richtlinien des Blutspendewesens mittels Plasmapherese gewonnenes Plasma bei + 4°C aufgetaut und das Kryopräzipitat durch
 30 Zentrifugation entfernt werden. Hieraus kann Faktor VIII hergestellt werden. Die Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes werden durch Adsorption an einen Anionenaustauscher, z. B. einen mit Diethylaminoethyl-Gruppen substituierten, vernetzten Dextran (wie z.B. DEAE-Sephadex® A50) abgetrennt.

35 Dem Ausgangsmaterial, mit oder ohne Gerinnungsfaktoren, wird vorzugsweise pro Liter soviel Gradientensalz, im Falle von Ammoniumsulfat soviel festes Ammoniumsulfat zugefügt, daß

nach mehreren Stunden, z.B. 3-20, Rühren bei Raumtemperatur, ggf. nach Zugabe von Wasser für Injektionszwecke die Leitfähigkeit einer entsprechenden Salz- insbesondere Ammoniumsulfat-Lösung, vorliegt, die für den Chromatographiebeginn, entsprechend der gewählten Anfangskonzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat, vorgesehen ist.

- 5 Nach Zugabe von 0,5-5 % Filterhilfsmittel, z.B. Standard Super Cell oder anderer geeigneter Filterhilfsmittel wie z.B. Perlite, Harbolite oder Celite, wird die Lösung filtriert.

Das Filtrat wird als Ausgangslösung für die Chromatographie eingesetzt.

Die hydrophobe Interaktionsphase wird dabei vorzugsweise auf die gewünschte Ausgangskonzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat entsprechend der gewählten

- 10 Konzentration in der Ausgangslösung äquilibriert.

Die chromatographische Trennung beruht auf der Wechselwirkung von hydrophoben Domänen der Proteinmoleküle mit hydrophoben Gruppen auf der stationären chromatographischen Phase. Unter physiologischen Bedingungen sind die hydrophoben Gruppen der

- 15 Proteinmoleküle nicht frei zugänglich, so dass eine Bindung an eine hydrophobe Interaktionsphase nicht stattfindet. Durch Hinzufügen des Salzes, insbesondere von Ammoniumsulfat wird die Hydrathülle des Proteins verringert, damit stehen die hydrophoben Domänen für eine hydrophobe Interaktion zur Verfügung.

- 20 Die Hydrophobizität der stationären Phase wird erfindungsgemäß somit so gewählt, dass eine Wechselwirkung bestimmter Proteine mit der Phase stattfinden kann. Die Bindung an die Phase hängt einerseits von der Hydrophobizität der chromatographischen Matrix, andererseits von der Salz- insbesondere der Ammoniumsulfatkonzentration der Lösung ab. Da bei hohen Salz- insbesondere Ammoniumsulfatkonzentrationen eine Präzipitation der Proteine erfolgt,
- 25 wird die Salz-z.B. die Ammoniumsulfatkonzentration entsprechend der Hydrophobizität der chromatographischen Phase so gewählt, dass die gewünschten Wechselwirkungen bei einer Salz- bzw. Ammoniumsulfatkonzentration, die überwiegend nicht zur Präzipitation führt, stattfinden.

- 30 Dies ergibt sich beispielsweise aus Tabelle 1, worin in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfatkonzentration der Anteil an noch in Lösung befindlichen Proteinen angegeben ist. Bei Werten von 1,4 Mol/l Ammoniumsulfat und darüber wird kein befriedigendes Ergebnis erhalten.

- 35 Somit zeigt sich, daß die Konzentration an Salz, insbesondere Ammoniumsulfat $< 1,4 \text{ Mol/l}$ sein sollte.

Zur wirksamen Trennung von Immunglobulin- und Albuminfraktion wird dementsprechend vorzugsweise bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von $< 1,4 \text{ Mol/l}$, auf die gewünschtenfalls die Chromatographie-Phase und die Ausgangslösung eingestellt wird, begonnen, vorzugsweise mit einem Puffer dieser Salzkonzentration nachgewaschen und nachfolgend die Ammoniumsulfatkonzentration gesenkt.

Besonders bevorzugt wird die Trennung vorgenommen, wenn die hohe Konzentration $0,6 \text{ bis } < 1,4 \text{ Mol/l}$, vorzugsweise bis $1,3 \text{ Mol/l}$, insbesondere $0,6 \text{ bis } 1,2 \text{ Mol/l}$, ganz besonders $0,7 \text{ bis } 1 \text{ Mol/l}$, insbesondere $0,8 \text{ bis } 0,9 \text{ Mol/l}$, und die abgesenkte Konzentration $0,4 \text{ bis } 0 \text{ Mol/l}$, insbesondere $0,3 \text{ bis } 0 \text{ Mol/l}$ beträgt.

Bei einem solchen Konzentrationsgefälle wird zunächst eine Albumin-haltige Fraktion und dann eine Immunglobulin-haltige Fraktion erhalten. Letztere kann noch Lipide enthalten, die vorteilhafterweise entfernt werden. Hierzu kann im zweiten Schritt eine weitere Konzentrationsstufe des Ammoniumsulfats eingesetzt werden, z.B. durch Beginn bei $0,4$, insbesondere $0,3 \text{ Mol/l}$, bis $0,1 \text{ Mol/l}$, insbesondere $0,3 \text{ bis } 0,15 \text{ Mol/l}$, ganz besonders bei $0,3 \text{ Mol/l}$ und anschließende Absenkung auf kleiner $0,1 \text{ Mol/l}$ bis 0 Mol/l . Dabei werden die Lipide erst bei der niedrigsten, ggf. Null (0 Mol/l)-Konzentration von der Phase entfernt und damit aus der Immunglobulinfraktion, die die Phase bei höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen verläßt, abgetrennt.

Bei der Chromatographie werden die üblichen Bedingungen, die für solche Phasen bekannt sind, eingehalten, wie z.B. pH-Wert (z.B. $7,0$), Natrium(hydrogen)Phosphatpuffer oder Trishydroxymethylaminomethan als Elutionsmittel. Phosphatpuffer sind besonders bevorzugt (z.B. $0,01 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4$).

Als hydrophobe Interaktionsphasen, sind für den erfindungsgemäßen Prozess die bekannten Materialien geeignet. Hierzu gehören z.B. Phenyl- oder Alkyl-substituierte Phasen auf der Basis von Copolymeren aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat, Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol oder mit Dextran oder Polymeren gecoatete Kieselgele.

Als besonders geeignet erwiesen sich Alkyl- und ganz besonders Phenyl-substituierte Copolymere aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat.

Diese sind unter den Handelsnamen TSK-Phenyl 5PW[®] und Toyopearl-Phenyl 650[®] kommerziell erhältlich.

Hierfür kann erfindungsgemäß beispielsweise eine Anfangs-Ammoniumsulfatkonzentration von 0,7 bis 1,0 Mol/l, vorzugsweise von 0,8 bis 1,0, insbesondere 0,9 Mol/l, für die chromatographische Separation gewählt werden.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, führt die chromatographische Trennung an TSK-Phenyl 5PW[®] bei solchen Konzentrationen zu besonders guten Ergebnissen.

So kann, wie oben beschrieben, die auf eine Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 Mol/l eingestellte Ausgangslösung auf die äquilibrierte hydrophobe Chromatographiephase aufgetragen werden. Bei dieser Salzkonzentration erhält man eine Fraktion 1, die die Phase ungebunden passiert. Die gebundenen Proteine werden mit 0,01 Mol/l Natriumphosphat, pH 7,0 als Fraktion 2 von der Phase abgelöst, d.h. die Ammoniumsulfatkonzentration wird hier auf 0 Mol/l abgesenkt.

In Tabelle 3 ist die Zusammensetzung der erhaltenen chromatographischen Fraktionen dargestellt.

Wie hieraus ersichtlich ist, erhält man eine Fraktion 1, die als Albuminfraktion bezeichnet wird und die in der Zusammensetzung einem Überstand II/III der Alkoholfraktionierung nach Cohn sehr ähnlich ist. Sie enthält die wichtigen Proteine Albumin, Transferrin, Antithrombin III und α -Antitrypsin.

In der Fraktion 2 sind fast quantitativ alle Immunglobuline enthalten und ähnelt daher der nach dem Kälte-Äthanol-Verfahren erhaltenen Zusammensetzung einer Paste II/III.

Wie aus Tabelle 3 weiter zu ersehen, sind in der Fraktion 2 auch alle Lipide und Lipoproteine enthalten. Diese können die Weiterverarbeitung der Fraktion 2 zu therapeutisch anwendbaren Proteinlösungen erschweren, so dass es sich als vorteilhaft erwiesen hat, einen weiteren Elutionsschritt zur Gewinnung einer 3. Fraktion in den Prozess zu integrieren.

Hierzu kann nach Gewinnung der Fraktion 1 bei der höchsten Konzentration, z.B. 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat begonnen und dann mit einem Stufengradienten weitergearbeitet werden. Beispielsweise kann bei 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat die Fraktion 2 isoliert werden.

Diese immunglobulinhaltige Fraktion 2 unterscheidet sich in der Proteinzusammensetzung nicht von der oben beschriebenen Fraktion (Tabelle 3, Fraktion 2), außer, dass der Gehalt an Lipoproteinen kleiner 5 % ist.

Die Lipoproteinfraktion bleibt bei 0,3 Mol/l und höheren Ammoniumsulfatkonzentrationen an die Chromatographiephase gebunden und kann mit 0,01 Mol/l Natriumphosphat, pH 7,0 als Fraktion 3 von der Phase eluiert werden, d.h. hier wird die Ammoniumsulfatkonzentration auf 0 Mol/l abgesenkt.

5

Vorzugsweise werden somit 3 Fraktionen bei der erfindungsgemäßen hydrophoben Interaktionschromatographie separiert, nämlich zunächst die Albuminfraktion, dann die Immunglobulinfraktion und dann die Lipoproteinfraktion.

10 Schematisch ist der erfindungsgemäße Prozess in **Abbildung 1** dargestellt.

2. Rezyklisierung

Bei der großtechnischen Anwendung des Verfahrens werden Puffersalz- wie

15 Ammoniumsulfat-haltige Pufferlösungen in beträchtlichen Mengen benötigt. Um diesen Verbrauch möglichst zu minimieren, wird erfindungsgemäß ein Rezyklisierungsverfahren angewendet, wie in Abbildung 2 dargestellt.

Dabei kann der auf die gewünschte Konzentration eingestellte z.B. Ammoniumsulfatpuffer 1 (hohe Konzentration) als Permeat aus der gewonnenen ersten Fraktion z.B. mittels geeigneter
20 Ultrafiltrationsmembranen rückgeführt werden, während die erste Fraktion kontinuierlich gesammelt und ankonzentriert wird. Zwecks Abtrennung der zweiten und ggf. dritten Fraktion wird dann ein Puffer mit der jeweils gewünschten Konzentration durch Mischen des Ammoniumsulfatpuffers 1 und einem Nicht-Gradientensalz, d.h. Nicht-Ammoniumsulfatpuffer
25 2 oder durch alleinigen Einsatz des Puffers 2 abgesenkt wie erfindungsgemäß angegeben und die zweite bzw. dritte Fraktion abgetrennt, je nachdem wie viele Fraktionen gewünscht sind.

Vorzugsweise werden, wie oben beschrieben, drei Fraktionen hergestellt durch Anwendung
30 eines Stufengradienten nach Abtrennung der Fraktion 1, wobei die vorstehend angegebenen Ammoniumsulfatkonzentrationen gewählt werden.

Das kontinuierliche Ankonzentrieren der Fraktionen kann z.B. mittels Ultrafiltration erfolgen.

35 Es wird ferner bevorzugt, die Chromatographiephase nach je einem Zyklus mit Natronlauge aus einem Vorratsbehälter 3 zu reinigen, wobei gleichzeitig eine Sterilisation erfolgt.

Beispielsweise kann nach der Beladung der Säule mit der auf einem Puffer 1 eingestellten und filtrierten Plasmaprotein-Lösung zur Gewinnung der Fraktion 1 mit Puffer 1 (z.B. 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH_2PO_4 pH 7,0) nachgewaschen werden, um die gesamte Fraktion 1 zu gewinnen. Die so gewonnene Fraktion 1 wird aufgefangen und kontinuierlich über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem cut off von 10 KD ankonzentriert. Das hierbei gewonnene Permeat wird in den Vorratskessel für Puffer 1 zurückgeführt.

Zur Elution der Fraktion 2 wird die Salz- bzw. Ammoniumsulfatkonzentration wie angegeben abgesenkt, wobei beispielsweise ein Mischpuffer hergestellt werden kann oder ein Puffer 2, welcher kein Salz, z.B. Ammoniumsulfat enthält, allein gewählt wird, je nachdem, wie viele Trennstufen gewünscht sind.

Bei einem Stufengradient können, beispielsweise zur Elution der Fraktion 2, die Puffer 1 (0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 7,0) und Puffer 2 (0,01 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 7,0) online im Verhältnis z.B. 1:3 gemischt werden. Dieses Mischungsverhältnis ergibt einen Elutionspuffer für die Fraktion 2 mit der gemischten Konzentration z.B. von 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 7,0.

Die gesammelte Fraktion 2 wird ebenfalls online über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem cut off von 10-30 KD ankonzentriert. Das hierbei anfallende Permeat wird verworfen.

Mit Puffer 2 (0,01 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 7,0) werden sodann die Lipoproteine von der hydrophoben Phase losgelöst und verworfen.

Dieses Verfahren kann unter Änderungen der Puffer/Salz-konzentrationen und Mischverhältnisse im erfindungsgemäßen jeweils gewünschten Bereich und üblichen, dem Fachmann für die genannten Chromatographiephasen bekannten Bedingungen variiert werden. So kann z.B. bei einer Puffer 1-Konzentration von 1 Mol/l mit Puffer 2 eine 1:1 – 1:5 etc. Mischung hergestellt werden.

Beim Prozessieren von großen Mengen werden mehrere chromatographische Zyklen durchgeführt.

Vorzugsweise wird daher nach jedem Separationszyklus die hydrophobe Phase mit 1,0 Mol/l NaOH gereinigt und gleichzeitig sterilisiert. Die Natronlauge befindet sich im Vorratsbehälter

3. Weiterverarbeitung

Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren an der hydrophoben Phase gewonnenen Fraktionen 1 und 2 können nach bekannten Verfahren, wie z.B. denen in den eingangs
 5 erwähnten Druckschriften beschriebenen zu therapeutisch anwendbaren hochreinen Plasmaprotein-Lösungen weiterverarbeitet werden. Solche Präparate werden bei jeweiligen Mangel- oder Krankheitszuständen eingesetzt, z.B. können bei Infektionen Präparate, die aus selektiertem Ausgangsmaterial erfindungsgemäß hergestellt wurden, wie z.B. solche
 10 enthaltend anti-CMV oder anti-HBs, anti-Varicella, Tetanus oder Anti-D bei entsprechender Infektion verabreicht werden.

Mengen und Abreichungsform sind hierbei jeweils bekannt, z.B. als Injektionen oder i.m.-Injektion oder i.v.-Infusion, wobei die pharmazeutische Zusammensetzung neben dem Wirkstoff die bekannten Hilfsstoffe aufweisen können. Hierzu gehören z.B. Elektrolyte,
 15 Aminosäuren oder Zucker.

a) Immunglobulin G

Beispielsweise kann aus der Immunglobulinfraktion (Fraktion 2) ein i. v. verträgliches,
 20 insbesondere Immunglobulin G hergestellt werden. Hierzu können bekannte Methoden wie schon in DE 3640513C2 sowie EP-B 447 585 beschrieben, angewandt werden. Diese Verfahrensweise ist in Abbildung 3 dargestellt und umfaßt im wesentlichen Anionenaustauscherchromatographie, ggf. Virenfiltration, Octansäurebehandlung, Kationenaustauscherchromatographie und übliche Konzentrations-, Filtrations- und
 25 Sterilisationsschritte.

So kann die ankonzentrierte Fraktion 2 von der hydrophoben Interaktionschromatographie z.B. mittels Diafiltration auf 0,05-0,10 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, vorzugsweise auf 0,06 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, umgepuffert werden.

30 Zur weiteren Aufarbeitung wird diese Lösung einer Anionenaustauschchromatographie unterworfen. Hierzu wird der Anionenaustauscher mit 0,01-0,05 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, vorzugsweise mit 0,03 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, äquilibriert und die diafiltrierte Proteinlösung mit Wasser für Injektionszwecke (WFI) verdünnt, so dass auch hier eine Salzkonzentration
 35 von 0,01-0,05 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, vorzugsweise mit 0,03 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5, vorliegt.

Unter diesen Bedingungen passiert eine Immunglobulin G-Rohfraktion ungebunden die Säule, während alle anderen Proteine an die chromatographische Phase binden.

Mit einem Puffer hoher Salzkonzentration (0,02 Mol/l NaH_2PO_4 , 1,0 Mol/l NaCl , pH 6,5)

5 werden die gebundenen Proteine eluiert.

Die Immunglobulin-G Rohfraktion wird gegebenenfalls über einen Virenfilter filtriert, mittels Ultra-/Diafiltration ankonzentriert und auf 0,01-0,05 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5, vorzugsweise 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5, umgepuffert.

10

Diese eingestellte Rohfraktion besteht aus > 99 % Immunglobulin-G, ist jedoch mit proteolytischen Enzymen verunreinigt.

Diese können gemäß EP 0447585B1 mit Oktansäure entfernt werden. Hierzu wird die

15 konditionierte Lösung mit 0,4 bis 1,5 Vol%, vorzugsweise 0,8 bis 1,0, insbesondere 0,8 % Oktansäure behandelt und unter Zusatz von CaCl_2 filtriert.

Anschließend erfolgt eine Virusinaktivierung mit 0,3 % Tri-n-butylphosphat und 1 % Tween 80. Nach Abschluß der Reaktionszeit wird die Lösung auf eine Leitfähigkeit eines 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0,-Puffers mit Wasser für Injektionszwecke eingestellt.

20

Die Agentien der Oktansäurebehandlung und Virusinaktivierung sowie die in der Lösung enthaltenen IgG-Aggregate werden durch Chromatographie an einem Kationenaustauscher entfernt. Hierzu trägt man die eingestellte Immunglobulin G-Lösung auf den äquilibrierten Kationenaustauscher auf, wäscht mit 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0, die Agentien aus und

25 eluiert die Immunglobulin G-Wertfraktion mit einem Puffer, bestehend aus 0,02 Mol/l Natriumacetat, 0,3 Mol/l Natriumchlorid, pH 5,0. Die Reinigung der Säule erfolgt durch 0,02 Mol/l Natriumacetat, 1,0 Mol/l Natriumchlorid, pH 5,0 und 1,0 Mol/l NaOH .

Die Immunglobulin G-Fraktion wird gegen 0,3 Mol/l Glycin, pH 5,0 diafiltriert und auf eine

30 Proteinkonzentration von 50 g/l ankonzentriert.

Analog kann das hochreine, iv-verträgliche IgG-Präparat auch nach anderen bekannten Verfahren aufgearbeitet werden.

35 Die so hergestellten intravenös verträglichen Immunglobulin G-Präparate weisen gegenüber herkömmlichen Lösungen, die üblicherweise durch Präzipitationen aus Plasma gewonnen

werden, einige Vorteile auf. So entspricht beispielsweise die IgG-Subklassenzusammensetzung der natürlichen, im Plasma vorkommenden Verteilung. Der IgA-Gehalt ist kleiner 0,15 % und der IgM-Gehalt kleiner 0,02 % des Gesamtproteingehaltes. Der Anteil an IgG-Aggregaten ist kleiner 0,25 %. Mögliche, zu Unverträglichkeitsreaktionen führende

- 5 Verunreinigungen, wie Prekallikreinaktivator, Prekallikrein, Kallikrein, Kininogen, Plasmin, Plasminogen und Faktor XI sind nicht nachweisbar. Alle anderen analytischen Parameter entsprechen der Europäischen Pharmakopoe für i. v. Immunglobulin G-Präparate.

- 10 Somit weist das so gewonnene Präparat alle erforderlichen Kriterien auf und unterscheidet sich von dem bekannten Produkt zum einen durch den höheren IgG-Anteil und ferner hinsichtlich der Subklassenzusammensetzung.

b) Albumin, Antithrombin III, Transferrin

- 15 Aus der erfindungsgemäß hergestellten Fraktion 1 lassen sich beispielsweise Antithrombin-III (AT-III), Transferrin und Albumin gewinnen.

- 20 Ein entsprechendes Verfahren ist in Abbildung 4 dargestellt und umfaßt im wesentlichen Affinitätschromatographie, Anionenaustauscherchromatographie, Virusinaktivierung sowie übliche Filtrations-, Konzentrations- und Sterilisationsschritte.

- So läßt sich aus der ultra- und diafiltrierten Fraktion 1 mittels Affinitätschromatographie an einem Heparinträger Antithrombin III aus diesen enthaltenden Ausgangsprodukten gewinnen. Eine solche Vorgehensweise ist in der EP-A 844 254 als Vorreinigungsstufe zur Gewinnung
- 25 von von Unreinheiten befreitem Antithrobin III beschrieben, wobei dort anschließend eine Hitze- und/oder Metallchelatatbehandlung erfolgt. Im erfindungsgemäßen Verfahren kann die Affinitätschromatographie somit ebenfalls durchgeführt werden, wobei hier eine niedrig konzentrierte Kochsalzlösung wie z.B. 0,1 bis 0,2 Mol/l Natriumchlorid zur Bindung von Antithrobin III und eine höhere Kochsalzkonzentration wie z.B. 1,0 bis 2,0 Mol/l Natriumchlorid
- 30 zur Eluierung führen. So kann man die Fraktion 1 auf ein Puffermilieu von 0,02 Mol/l, NaH_2PO_4 , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0, einstellen und trägt auf die Affinitätsphase auf.

- Albumin und Transferrin passieren die Säule ungebunden. Man wäscht die Säule mit 0,02 Mol/l, NaH_2PO_4 , 0,4 Mol/l NaCl, pH 7,0 und eluiert anschließend das an den
- 35 Heparinträger gebundene AT-III mit 0,02 Mol/l, NaH_2PO_4 , 2,0 Mol/l NaCl, pH 7,0. Die gewonnene AT-III Lösung wird auf physiologische Bedingungen umgepuffert und kann nach

bekannten Methoden, wie z. B. Virusfiltration und Pasteurisierung zu einem therapeutisch anwendbaren Präparat weiterverarbeitet werden.

Die Albumin und Transferrin enthaltende Durchlauffraktion der Affinitätschromatographie kann
5 gemäß DE 3733181C1 zu Transferrin und gemäß EP 0402205B1 oder EP 0792887A1 zu Albumin aufgetrennt werden.

So kann beispielsweise nach Umpufferung der o. g. Durchlauffiltration der Affinitäts-
chromatographie auf 0,02 Mol/l Tris, 0,030 Mol/l NaCl, pH 7,0, die Lösung auf einen
Anionenaustauscher aufgetragen werden. Das Transferrin wird als Durchlauffraktion
10 aufgefangen und mittels bekannter Methoden virusinaktiviert und weiterverarbeitet. Die vom Anionenaustauscher anschließend mit 0,02 Mol/l Tris, 1,0 Mol/l NaCl, pH 7,0, eluierte Albuminfraktion kann beispielsweise auf eine Leitfähigkeit von 1,8 mS/cm mit einem Natriumacetatpuffer, pH 6,0, eingestellt und erneut einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen werden. Durch Umstellen des pH-Wertes auf 5,2 werden eventuell vorhandene
15 Spuren von Transferrin entfernt. Die Elution des Albumins vom Anionenaustauscher erfolgt bei pH 4,5 und einer Leitfähigkeit von 1,8 mS/cm. Die Weiterverarbeitung zu einem therapeutisch anwendbaren Albuminpräparat erfolgt nach bekannten Methoden.

Für alle in den obengenannten Verfahren angewandten chromatographischen Schritte werden
20 bekannte Materialien verwendet.

Als Kationenaustauscher können z.B. CM-Accell®, SP-Spherodex®, SP-Trisacryl-LS® oder Fraktogel-TSK-SP 650®, Poros HS® oder S-HyperDF® oder SOURCE-30S®, CM-HyperDF® verwendet werden und die Salzkonzentration entsprechend eingestellt werden.

Als Anionenaustauscher können z.B. QMA-Accell®, DEAE-Spherosil® oder DEAE-
25 Sepharose®, PorosHQ®, Q-HyperDF®, SOURCE 30Q® eingesetzt werden.

Weitere geeignete Materialien sind CM-Accell®, SP-Sperodex-M® oder auf der Basis synthetischer Polymere hergestellte Phasen wie SP-Trisacryl-LS® und CM-Trisacryl-LS®.

Für die Affinitätschromatographie kann z.B. Heparin-Sepharose® oder Heparin- immobilisierte synthetische Polymere wie z.B. Toyopearl AF-Heparin 650M® eingesetzt werden, wobei als
30 Puffer ebenfalls die o.g. Zusammensetzungen gewählt werden können.

Vorzugsweise werden im erfindungsgemäßen Verfahren chromatographische Medien auf der Basis synthetischer Polymere eingesetzt, wie die unter den Handelsnamen Poros®, Source®, Macrorep®, TSK®, Toyopearl® und Hyper D® kommerziell erhältlichen.

35 Die genannten Phasen sind substituiert als Anionen-, Kationenaustauscher, Hydrophobe-Interaktions- und Affinitätsmatrix verfügbar. Dabei bilden tertiäre oder quaternäre

Aminogruppen Anionenaustauscher, Beladung mit Sulfoalkyl oder Carboxyalkylgruppen
Kationenaustauscher, Substituenten wie Alkyl oder Phenyl bzw. Heparin-Gruppen
Hydrophobe Phasen bzw. Affinitätsmatrices. Die jeweiligen Puffermedien und
Elutionsbedingungen hierfür sind dem Fachmann bekannt.

5

Aufgrund ihrer relativen Druckstabilität erlauben sie auch bei geringer Partikelgröße hohe
Flußraten. Damit lassen sich die beschriebenen Prozesse in kurzer Zeit und mit hohem
Durchsatz ökonomisch gestalten.

Darüberhinaus bieten diese Chromatographiephasen den Vorteil, dass sie chemisch inert
10 gegenüber sterilisierenden Agentien und somit für die Herstellung von pharmazeutischen
Produkten besonders geeignet sind.

Zur Sterilisation können Behandlungen, vorzugsweise vor dem Chromatographie-Schritt, mit
β-Propiolacton, TNBP/Tween, TNBP/Na-Cholat, TNBP, gegebenenfalls in Kombination mit
15 UV-Bestrahlung oder Virenfiltration angewendet werden. Die eingesetzten Filter wie z.B.
Planova®, Virosolv®, UltriporDV50® sind bekannt.

Die auf diese Weise erfindungsgemäß hergestellten Produkte können flüssig oder lyophilisiert
gelagert werden.

20

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß auf schnelle und einfache
Weise die genannten Ausgangsmaterialien so gereinigt werden können, daß die erhaltenen
reinen Produkte ohne wesentliche Ausbeuteverluste gewonnen werden können und ihrer
natürlichen Zusammensetzung im wesentlichen entsprechen.

25

Die Erfindung wird durch nachstehende Beispiele erläutert.

Beispiel 1

30

Als Ausgangsmaterial werden 5,4 l eines von Gerinnungsfaktoren befreiten Humanplasmas
eingesetzt. Die Entfernung der Gerinnungsfaktoren erfolgt nach bekannten Methoden durch
Abtrennung des Kryopräzipitates und durch Adsorption der PPSB-Faktoren an DEAE-
Sephadex-A50®.

35

Zu diesem vorbehandelten Plasma werden pro Kilogramm 1,2 Mol Ammoniumsulfat zugegeben und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit Wasser für Injektionszwecke (WFI) auf eine Leitfähigkeit von 112 mS/cm (20°C) entsprechend der Leitfähigkeit einer 0,9 molaren Ammoniumsulfatlösung verdünnt und 6-12 h weitergerührt.

- 5 Nach Zugabe von 2 % (w/w) Filterhilfsmittel (z. B. Standard Super Cell) und erneutem Rühren über 1 Stunde wird die Lösung über einen Tiefenfilter, z. B. Seitz Supra 80P, geklärt.

- 10 Eine Stahlsäule (373 ml) gefüllt mit TSK-Phenyl 5PW[®] wird mit 0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH₂PO₄, pH 7,0 äquilibriert. Bei einem Fluß von 70 ml/min wird die vorbereitete und filtrierte Plasmaproteinlösung in Portionen von 370 ml aufgetragen. Nach Ende des Auftrages wird mit 5 Säulenvolumen des Äquilibrierpuffers nachgewaschen und diese Fraktion gesammelt (Fraktion 1). Während des Sammelns der Fraktion 1 erfolgt eine gleichzeitige Ultrafiltration an einer 10 KD Membran, z. B. Omega[®], Pall-Filtron, wobei das Permeat in den Vorratsbehälter des Äquilibrierpuffers zurückgeführt wird.

15

Danach wird mit dem 4fachen Säulenvolumen eines Elutionspuffer, bestehend aus 0,3 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH₂PO₄, pH 7,0, die Fraktion 2 gewonnen.

- 20 Der Elutionspuffer wird über ein Mischventil aus dem Äquilibrierpuffer (0,9 Mol/l Ammoniumsulfat, 0,01 Mol/l NaH₂PO₄, pH 7,0) und einer 0,01 Mol/l NaH₂PO₄, pH 7,0, Lösung hergestellt. Hierzu werden die beiden Puffer im Verhältnis 1:3 online gemischt.

Durch Aufgabe von 3 Säulenvolumen 0,01 Mol/l NaH₂PO₄, pH 7,0-Puffer wird die Lipoprotein-Fraktion (Fraktion 3) von der Säule abgelöst und verworfen.

- 25 Nach einem Reinigungsschritt mit dem 3fachen Säulenvolumen einer 1 Mol/l NaOH-Lösung wird die Säule mit WFI freigewaschen und erneut äquilibriert.

- 30 Zur Aufarbeitung der gesamten eingesetzten filtrierten Proteinlösung sind 26 Zyklen erforderlich, wobei die Fraktionen 1 und 2 jeweils in einem Sammelbehälter aufgefangen werden.

Danach erfolgt eine Sterilfiltration der separierten Fraktionen 1 und 2.

- | | | |
|----|--|--------|
| | Ausbeute, Immunglobulin G in Fraktion 2, | 90,3 % |
| 35 | Ausbeute, Albumin in Fraktion 1, | 100 % |

Zusammensetzung der Fraktionen 1 und 2 in der Kapillarzonenoelektrophorese

	Fraktion 1	Fraktion 2
γ -Globulin (%)	0	61,5
β -Globulin (%)	6,1	13,5
α_1 -Globulin (%)	4,3	2,1
α_2 -Globulin (%)	7,7	13,3
Albumin (%)	81,9	1,8
Fibrinogen (%)	0	7,6

5 **Beispiel 2**

Man verfährt wie in Beispiel 1.

Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird, wie in Beispiel 1 beschrieben, an einer TSK-Phenyl 5PW[®]-Säule chromatographiert.

Nach Elution der Fraktion 1 werden mit 0,01 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 7,0, die Immunglobuline und Lipoproteine in einer Fraktion von der Säule abgelöst.

15 Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	95,5 %

20

Beispiel 3

Man verfährt wie in Beispiel 1.

Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird an einer 3 l Säule (180x250 mm), gefüllt mit Toyopearl-Phenyl 650 M[®], chromatographiert.

- 5 Die Vorgehensweise entspricht dem Beispiel 1.
Pro Zyklus werden 2,4 l der Ausgangslösung bei einer Flußrate von 300 ml/min prozessiert.
Mit dieser Säule sind 3 Zyklen zur Aufarbeitung von 4 l Plasma notwendig.

Wie in Beispiel 1 werden 3 Fraktionen gesammelt.

10

Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	96 %

15

Beispiel 4

Man verfährt wie in Beispiel 2.

20

Die von Gerinnungsfaktoren befreite, mit Ammoniumsulfat versetzte und filtrierte Proteinlösung wird an einer 2,5 l Säule, gefüllt mit Toyopearl-Phenyl 650 M[®], chromatographiert.

Die Vorgehensweise entspricht dem Beispiel 2.

25

Pro Zyklus werden 2,4 l der Ausgangslösung bei einer Flußrate von 125 ml/min in 2 Fraktionen aufgetrennt. Hierzu werden 3 Zyklen benötigt.

- 30 Die erhaltenen Fraktionen zeigen folgende Ausbeuten:

Fraktion 1:	Albuminausbeute	100 %
Fraktion 2:	Ausbeute Immunglobulin G	95 %

35

Beispiel 5

Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Cytomegalievirus (anti-CMV) eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	90,5 %
10	Ausbeute Anti-CMV-Titer	78 %

Beispiel 6

15 Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Hepatitis-B-Virus (anti-HBs) eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

20 Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	92,0 %
	Ausbeute Anti-HBs-Titer	82 %

Beispiel 7

25

Man verfährt wie in den Beispielen 1, 2, 3 oder 4. Anstelle eines polyvalenten Ausgangsplasmas wird ein vorselektiertes Humanplasma mit einem hohen Titer gegen Anti-D eingesetzt und entsprechend den Beispielen 1 oder 2 oder 3 oder 4 prozessiert.

30 Die daraus erhaltene Fraktion 2 zeigt folgende Ausbeuten:

	Ausbeute Immunglobulin G	91,2 %
	Ausbeute Anti-D-Titer	54 %

35

Beispiel 8

Eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Immunglobulin G-haltige Fraktion 2 wird mittels Ultra- und Diafiltration auf 0,06 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5 und eine Proteinkonzentration von ca. 50 g/l eingestellt. Danach erfolgt eine Verdünnung mit Wasser für Injektionszwecke (WFI) im

5 Verhältnis 1:2. Nach einer Rührzeit von 1 Stunde wird klär- und sterilfiltriert.

Eine Stahlsäule (383 ml), gefüllt mit einem Anionenaustauscher, z. B. Poros HQ50[®], wird mit einem Puffer, 0,03 Mol/l NaH_2PO_4 , pH 6,5 äquilibriert.

10 500 ml der konditionierten Immunglobulin G-haltigen Lösung werden mit einem Fluß von 120 ml/min auf die Säule aufgetragen. Man wäscht mit 10 Säulenvolumen des Äquilibratorpuffers nach und fängt diese Immunglobulin G-haltige Fraktion auf.

Die restlichen gebundenen Proteine werden mit 0,02 Mol/l NaH_2PO_4 , 1,0 Mol/l NaCl, pH 6,5

15 von der Säule abgelöst. Zur Reinigung wird mit 2 Säulenvolumen 1 Mol/l NaOH gewaschen und anschließend erneut äquilibriert.

Die Gesamtmenge von 2,5 l der Ausgangslösung wird in 5 Zyklen chromatographiert.

20 Die Immunglobulin G-haltige Auftrags- und Durchlaufraction wird über einen Virusfilter, z. B. Planova 35, filtriert, mittels Ultra- und Diafiltration auf 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5 umgepuffert und auf eine Proteinkonzentration von ca. 40 g/l eingestellt. Zu dieser Lösung fügt man 0,8 % (v/v) Oktansäure zu, rührt eine Stunde und hält den pH-Wert mit 1 Mol/l NaOH auf pH 5,5. Danach fügt man 0,05 Mol CaCl_2 zu, korrigiert den pH-Wert mit 1 Mol/l NaOH auf

25 5,5 und rührt erneut 2 Stunden.

Anschließend wird die Lösung mit 2 % (w/v) Filterhilfsmittel, z. B. Standard Super Cell, versetzt und über einen Klärfilter, z. B. Seitz Supra 80P filtriert.

30 Der Filterkuchen wird 2 mal mit jeweils 100 ml 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,5 nachgewaschen.

Die filtrierte Lösung wird mit 0,3 % TNBP (Tri-n-butylphosphat) und 1 % Tween 80 (Polysorbat 80) versetzt und mindestens 8 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

35

Nach Beendigung der Reaktionszeit wird durch Verdünnen mit WFI auf eine Leitfähigkeit eines 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0-Puffers eingestellt und der pH-Wert mit 10 %iger Essigsäure auf pH 5,0 korrigiert.

- 5 Eine Stahlsäule (388 ml), gefüllt mit einem Anionenaustauscher, z. B. Poros HS50[®], wird mit einem Puffer, 0,02 Mol/l Natriumacetat, pH 5,0 äquilibriert.

2,15 l der konditionierten Immunglobulin G-Lösung werden mit einem Fluß von 120 ml/min auf die Säule aufgetragen. Man wäscht mit dem 10fachen Säulenvolumen an

- 10 Äquilibrierungspuffer, um die Reagenzien der Oktansäure- und Solvent-Detergent-Behandlung zu entfernen. Diese Waschfraktion wird verworfen.

Das gebundene Immunglobulin G wird mit 0,02 Mol/l Natriumacetat, 0,3 Mol/l NaCl, pH 5,0 von der Säule losgelöst und aufgefangen.

15

Die Reinigung der Säule erfolgt mit 0,02 Mol/l Natriumacetat, 1,0 Mol/l NaCl, pH 5,0 gefolgt von 1,0 Mol/l NaOH.

20

Danach wird die Säule erneut äquilibriert. Die Gesamtmenge von 2,3 l der Ausgangslösung wird in 2 Zyklen chromatographiert.

Mittels Ultra- und Diafiltration gegen 0,3 Mol/l Glycin, pH 5,0 wird die Immunglobulin G-Fraktion isoton eingestellt, auf einen Proteingehalt von 50 g/l ankonzentriert und sterilfiltriert.

Ausbeute Immunglobulin G: 74 %

Analytische Daten einer 5 % Immunglobulin G-Lösung

5

Antikomplementäre Aktivität	0,68 CH ₅₀ /mg Protein
Immunglobulin A	0,14 %
Immunglobulin M	0,02 %

Subklassen:

IgG ₁	57,6 %
IgG ₂	33,3 %
IgG ₃	5,5 %
IgG ₄	3,6 %

Cellulose-Acetat-Elektrophorese	100 % γ -Globulin
---------------------------------	--------------------------

Prekallikreinaktivator	neg.
Prekallikrein	neg.
Kallikrein	neg.
Kininogen	neg.
Plasmin	neg.
Plasminogen	neg.
Faktor XI	neg.

HPSE-Chromatogramm siehe Abbildung 5

Beispiel 9

Eine gemäß Beispiel 1 hergestellte Albuminhaltige Fraktion 1 wird mittels Ultra- und Diafiltration auf 0,02 Mol/l, NaH_2PO_4 , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0 eingestellt.

5

Eine 50 ml Säule (1,5 x 25 cm), gefüllt mit AF-Heparin Toyopearl[®], wird mit 0,02 Mol/l NaH_2PO_4 , 0,150 Mol/l NaCl, pH 7,0 äquilibriert.

100 ml der konditionierten Albumin-haltigen Fraktion werden mit einem Fluß von 7 ml/min auf die Säule aufgetragen. Man spült mit 5 Säulenvolumen des Äquilibrierungspuffers nach und fängt diese Albumin-haltige Fraktion auf.

Mit 0,02 Mol/l NaH_2PO_4 , 0,4 Mol/l NaCl, pH 7,0 wird die Säule nachgewaschen und diese Fraktion verworfen. Die Elution des AT-III erfolgt mit einem Puffer, bestehend aus 0,02 Mol/l NaH_2PO_4 , 2,0 Mol/l NaCl, pH 7,0. Diese Wertfraktion wird mittels Ultra-/Diafiltration auf PBS umgepuffert, ankonzentriert und sterilfiltriert.

Die erhaltene AT-III Lösung zeigt folgende Daten:

20

AT-III Ausbeute	91 %
Protein	1,1 g/l
AT-III-Aktivität	805 % d.N.
AT-III-Antigen	1,0 g/l
25 Albumin	< 0,006 g/l

HPSE-Chromatogramm siehe Abbildung 6

Tabelle 1

**Ermittlung der Ammoniumsulfatkonzentration zur hydrophoben
Interaktionschromatographie**

5

	Protein (g/l)	IgG (g/l)	IgA (g/l)	IgM (g/l)	Albumin (g/l)
Ausgang	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,5 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,7 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
0,8 Mol Ammoniumsulfat	26,7	3,59	0,78	0,34	15,8
1,0 Mol Ammoniumsulfat	26,0	3,40	0,72	0,35	14,8
1,2 Mol Ammoniumsulfat	24,9	1,93	0,38	0,21	15,7
1,4 Mol Ammoniumsulfat	22,0	0,73	0,16	0,10	14,4

Tabelle 2

Beispiel für eine FraktionierungsmethodeHydrophobe Interaktionschromatographie von Humanplasma bei unterschiedlichen Ammoniumsulfatkonzentrationen

5

	0,7 Mol	0,8 Mol	1,0 Mol
Ausgang			
Albumin (%)	100	100	93,7*
IgG (%)	100	100	94,7*
Fraktion 1			
Albumin (%)	> 95,0	> 95,0	> 95,0
IgG (%)	34,4	< 2,6	< 2,0
Fraktion 2			
Albumin (%)	1,4	1,8	3,3
IgG (%)	57,2	> 95,0	> 95,0

*Präzipitation durch Ammoniumsulfat

Tabelle 3

Verteilung der relevanten Plasmaproteine in Fraktionen der hydrophoben
Interaktionschromatographie

5

	Ausgang (%)	Fraktion 1 (%)	Fraktion 2 (%)
IgG	100	< 5	> 90
IgA	100	< 2	> 95
IgM	100	< 5	> 90
Albumin	100	> 95	< 2
Transferrin	100	> 95	< 2
AT-III	100	> 90	< 10
α_1 -Antitrypsin	100	> 90	< 5
Lipide/Lipoproteine	100	< 5	> 70

Patentansprüche

1. Verfahren zur Fraktionierung von Plasma oder Serum, dadurch gekennzeichnet, daß man die das Plasma oder Serum enthaltende Ausgangslösung einer hydrophoben
5 Interaktions-chromatographie unterwirft und unter Anwendung eines stufenweisen Salzgradienten wenigstens in eine Immunglobulin- und eine Albumin-haltige Fraktion auftrennt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial ein
10 Plasma oder ein Serum humanen oder tierischen Ursprungs verwendet wird.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie mit einem Ammoniumsulfatsalzgradienten erfolgt.
- 15 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Chromatographie bei hoher Ammoniumsulfatkonzentration beginnt und diese im nächsten Fraktionsschritt abgesenkt wird.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe
20 Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0,6 und <1,4 Mol/l und die niedrige Ammoniumsulfatkonzentration zwischen 0 und 0,4 Mol/l beträgt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,7 bis 1 Mol/l beträgt und abgesenkt wird auf 0 bis
25 0,3 Mol/l.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausgangslösung und die Chromatographie-Phase bei Beginn der Trennung auf die gewünschte hohe Salzgradientenkonzentration eingestellt wird.
30
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasma von den Gerinnungsfaktoren des PPSB-Komplexes befreit ist.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß als
35 Ausgangsmaterial ein von Gerinnungsfaktor VIII befreites Plasma eingesetzt wird.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial polyvalentes Humanplasma verwendet.
- 5 11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangsmaterial bezüglich viraler, bakterieller oder gegen zelluläre Antigene gerichtete Antikörper selektiertes Humanplasma verwendet.
- 10 12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß nach der gewonnenen ersten Fraktion mittels Stufengradienten zwei weitere Fraktionen gewonnen werden.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Auftrennung nach der ersten Fraktion mit einem Ammoniumsulfatpuffer einer Konzentration von 0,4 bis 0,1 Mol/l beginnt und danach abgesenkt wird auf < 0,1 bis 0 Mol/l.
- 20 14. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl- oder Alkyl-substituierte Phasen auf der Basis von Copolymeren aus Glycidyl-methacrylat und Ethylenglycol-dimethacrylat, Copolymere aus Polystyrol und Divinylbenzol oder mit Dextran oder Polymeren gecoatete Kieselgele verwendet werden.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als hydrophobe Interaktionsphase Phenyl-substituierte Copolymere aus Glycidylmethacrylat und Ethylenglycoldimethacrylat verwendet wird.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß die hohe Ammoniumsulfatpufferkonzentration 0,8 bis 1,0 Mol/l und die abgesenkte Ammoniumsulfatkonzentration 0,3 bis 0 Mol/l beträgt.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die erste Fraktion bei einer Ammoniumsulfatkonzentration von 0,9 Mol/l gewonnen wird und danach ein Stufengradient angewendet wird, wobei die Ammoniumsulfatkonzentration zunächst 0,3 Mol/l beträgt, und sodann auf 0 Mol/l abgesenkt wird.

18. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.
- 5 19. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß die gewonnene erste Fraktion durch Affinitätschromatographie sowie nachfolgende Anionenaustauscherchromatographie und Virusinaktivierung sowie übliche Filtrations-, Konzentrations- und Sterilisierungsschritte aufgearbeitet wird.
- 10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch einsetzbares Immunglobulin, insbesondere IgG gewinnt.
- 15 21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion durch Anionenaustauscherchromatographie, Virusinaktivierung, Oktansäurebehandlung sowie Kationenaustauscherchromatographie und übliche Filtrations-, Sterilisations- und Konzentrierungsschritte zu einem verträglichen Immunglobulin G Präparat aufarbeitet.
- 20 22. Rezyklisierungsverfahren zur Fraktionierung von Plasma oder Serum gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß man das Permeat aus der ersten erhaltenen Fraktion kontinuierlich dem Ammoniumsulfatpuffer-Vorratsbehälter mit der Pufferlösung 1 zuführt, die gewonnene erste Fraktion kontinuierlich sammelt, die zweite Fraktion durch Herstellen eines Mischpuffers aus der Pufferlösung 1 und einer
- 25 Ammoniumsulfat-freien Pufferlösung 2 oder alleinigen Einsatz des Puffers 2 eluiert und kontinuierlich entfernt.
23. Verfahren gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Eluierung der ersten Fraktion die Chromatographiesäule mit einem Stufengradienten behandelt und
- 30 so eine zweite und dritte Fraktion erhält.
24. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß man nach je einem Rezyklisierungskreislauf die Interaktionschromatographiephase mit Natronlauge aus einem Vorratsbehälter 3 behandelt.
- 35

25. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene erste Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Antithrombin III, Transferrin und/oder Albumin gewinnt.
- 5 26. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die gewonnene zweite Fraktion in an sich bekannter Weise aufarbeitet und therapeutisch verwendbares Immunglobulin, insbesondere IgG, gewinnt.
- 10 27. Immunglobulinpräparat, erhalten nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 20, 21 oder 26.
28. Antithrombin III Präparat, erhalten gemäß Anspruch 18, 19 oder 25.
- 15 29. Verwendung eines Immunglobulinpräparates oder eines Antithrombin III-, Albumin- oder Transferrin-Präparates, erhalten nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 26 zur therapeutischen Anwendung.

Abbildung 1

Fraktionierschema

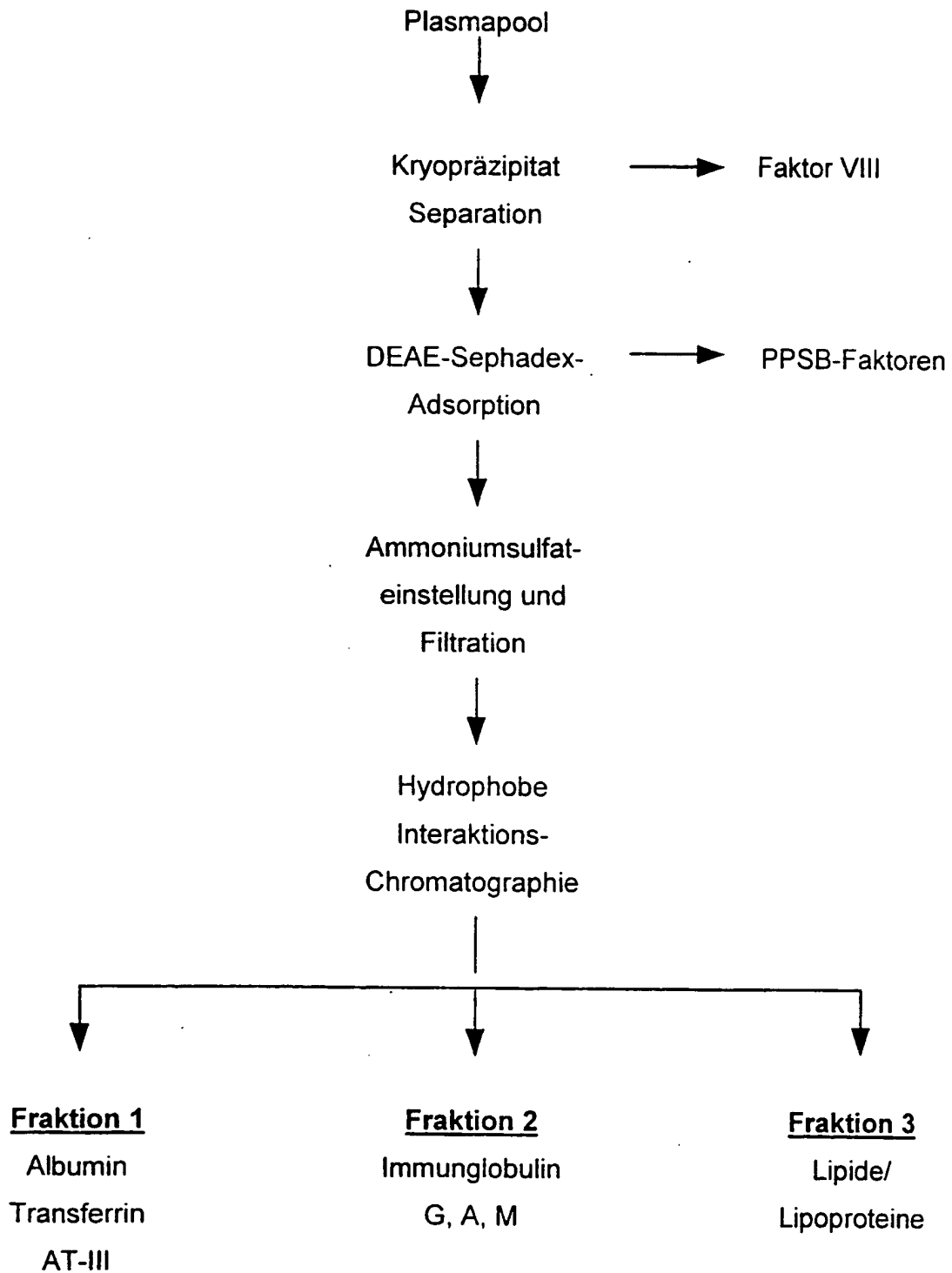
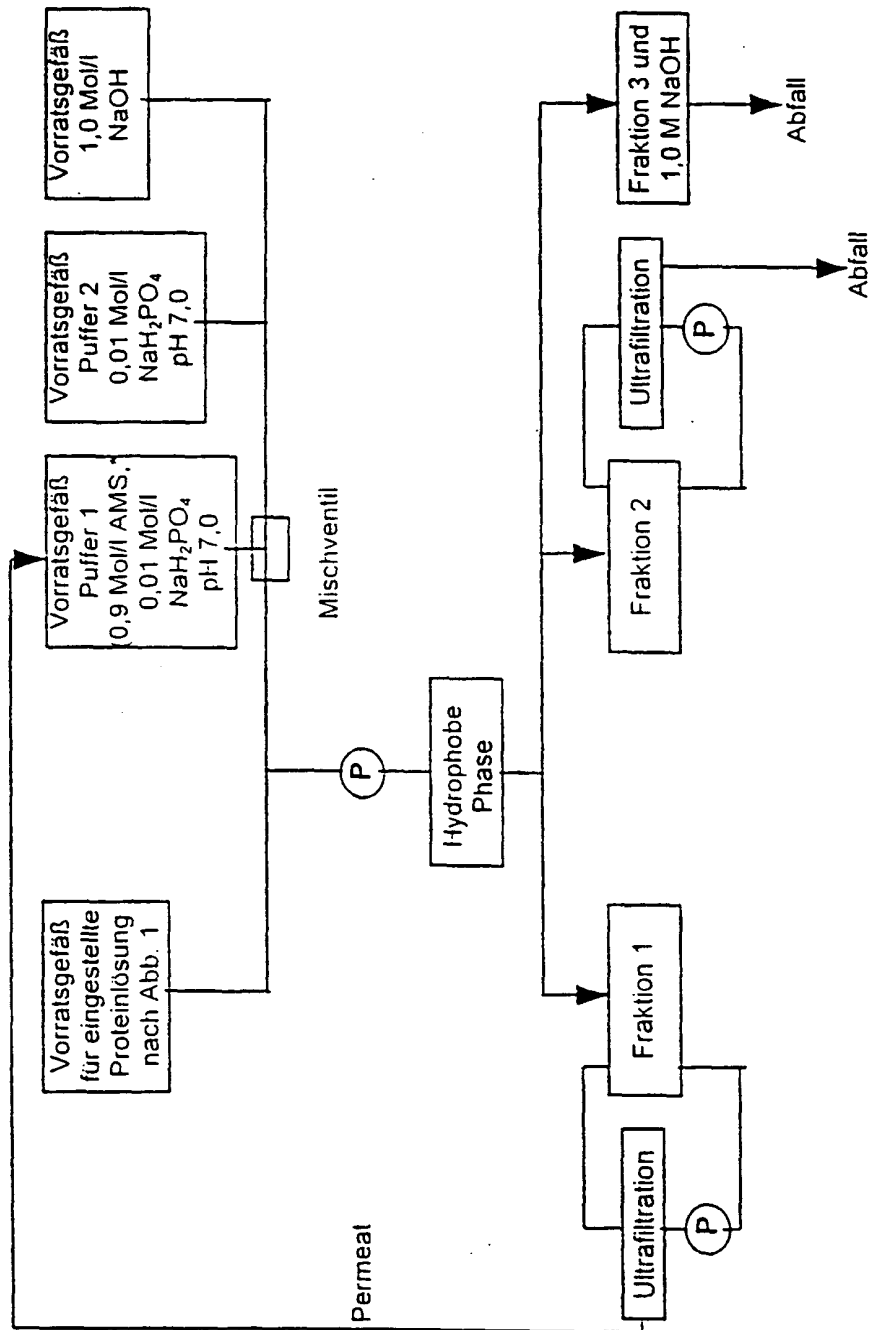


Abbildung 2

Verfahrensschema



*AMS=Ammoniumsulfat

Abbildung 3

Herstellungsschema für i.v. Immunglobulin G

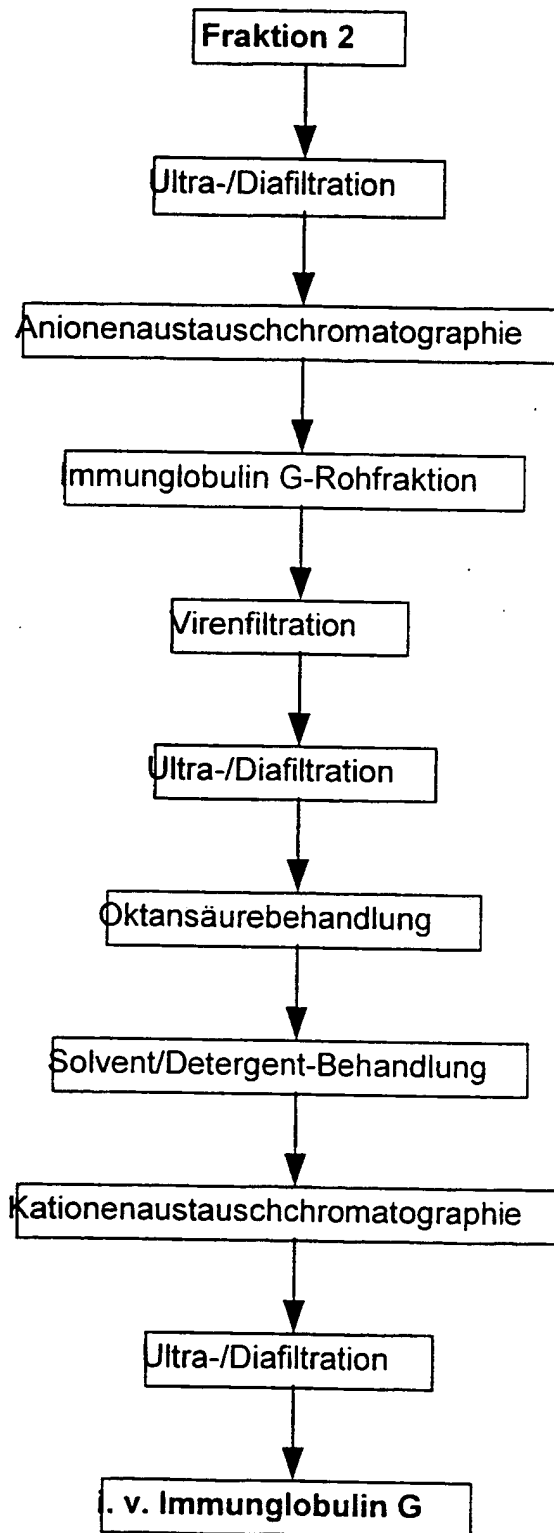
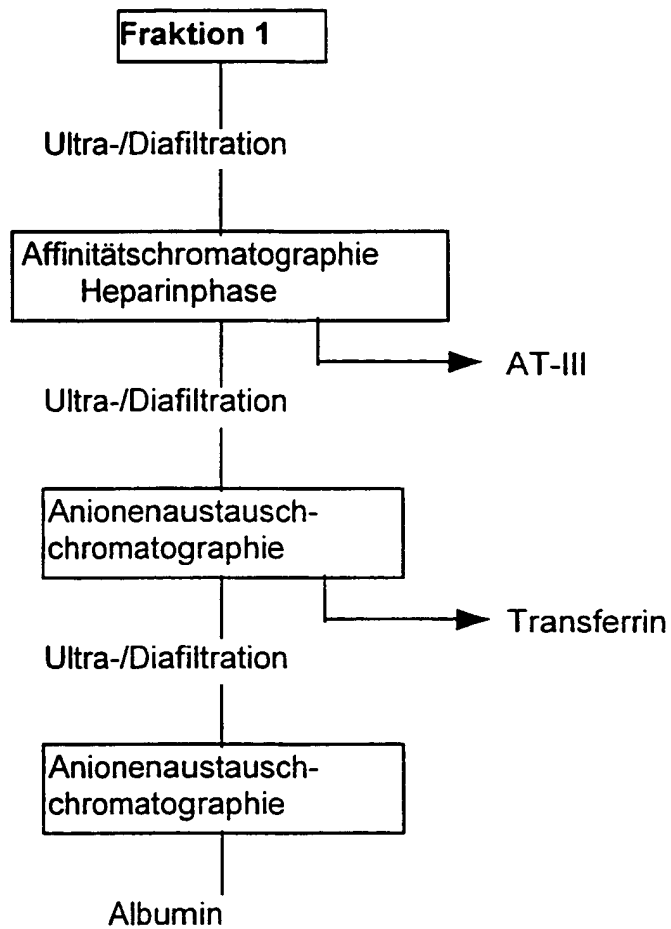


Abbildung 4

Herstellschema von AT-III, Transferrin und Albumin

HPSE-Chromatogramm einer gemäß Beispiel 8
hergestellten Immunglobulin G-Lösung

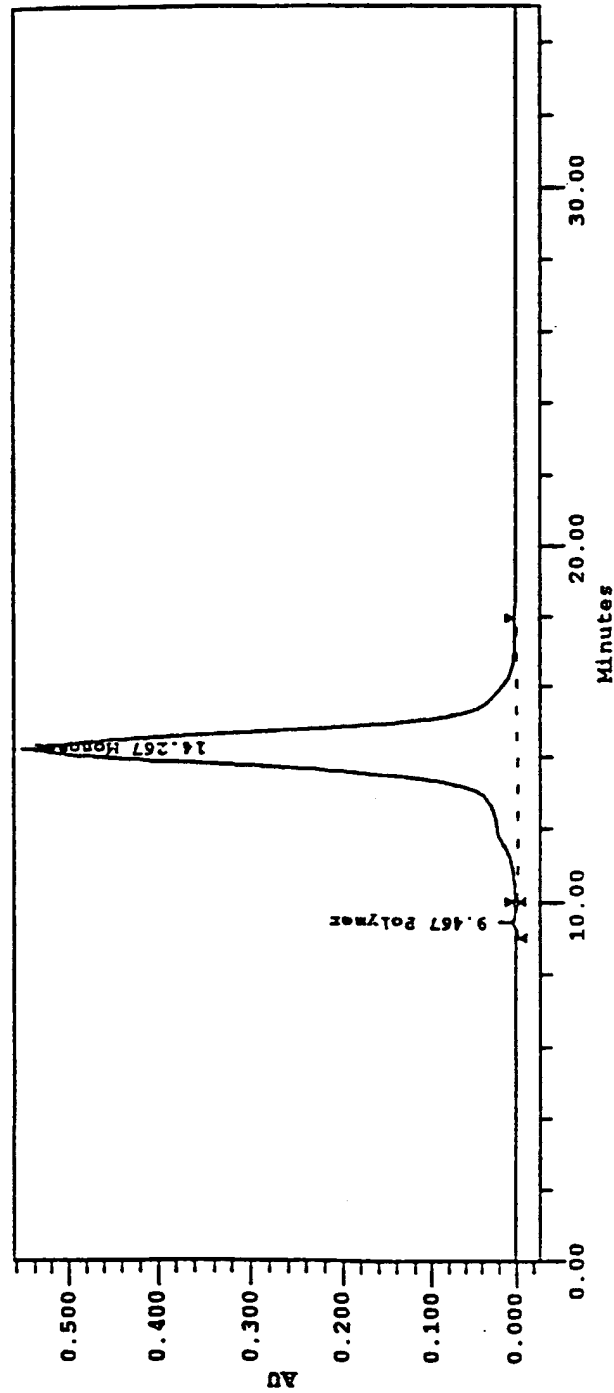


Abbildung 5

Ergebnis:

#	Ret Time (min)	Area (UV*sec)	% Area	Name
1	9.467	74539	9.18	Polymer
2	14.267	4075777	99.82	Monomer

Date of Deposit : January 11, 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/05827

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K1/20 C07K14/765 C07K16/06 C07K14/81 C07K14/79

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HRKAL Z ET AL: "HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF SERUM PROTEINS ON PHENYL SEPHAROSE CL-4B" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 242, no. 2, 1982, pages 385-388, XP000946223	1-21
Y	ISSN: 0021-9673 page 385, paragraph 3; figures 1-3; table I	18-21, 27-29

	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 September 2000

Date of mailing of the international search report

06/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340 2046

Authorized officer

Carviani S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/05827

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOHEEN S C ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN SERUM GAMMA GLOBULINS BY HYDROPHOBIC INTERACTION HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 326, 1985, pages 235-241, XP000946239 ISSN: 0021-9673 cited in the application	1-21
Y	page 236, last paragraph; figures 1A, 1B, 3, 5	18-21, 27-29
Y	US 5 429 746 A (SHADLE PAULA J ET AL) 4 July 1995 (1995-07-04) claims	18-21, 27, 29
Y	EP 0 339 919 A (GREEN CROSS CORP) 2 November 1989 (1989-11-02) claims	18-21, 28, 29
Y	EP 0 717 049 A (AIMA DERIVATI SPA ; SCLAVO SPA (IT)) 19 June 1996 (1996-06-19) claims	18-21
A	SZEPESZ L ET AL: "HIGH PERFORMANCE HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS" LC-GC INTERNATIONAL (LIQUID AND GAS CHROMATOGRAPHY), US, EUGENE, OR, vol. 5, no. 11, 1992, pages 24-29, XP000350924	-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05827

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5429746 A	04-07-1995	AU 689552 B	02-04-1998
		AU 1843395 A	04-09-1995
		BR 9507100 A	16-09-1997
		CA 2183888 A	24-08-1995
		CN 1146730 A	02-04-1997
		CZ 9602481 A	16-04-1997
		EP 0746398 A	11-12-1996
		HU 74845 A, B	28-02-1997
		JP 9509658 T	30-09-1997
		NO 963475 A	21-10-1996
		NZ 281480 A	26-06-1998
		WO 9522389 A	24-08-1995
		ZA 9501372 A	24-10-1995
EP 0339919 A	02-11-1989	JP 1275600 A	06-11-1989
		JP 2729484 B	18-03-1998
		JP 2004717 A	09-01-1990
		JP 2678249 B	17-11-1997
		DE 68925918 D	18-04-1996
		DE 68925918 T	02-10-1996
		EP 0682949 A	22-11-1995
		ES 2084599 T	16-05-1996
		KR 139049 B	30-04-1998
EP 0717049 A	19-06-1996	IT FI930260 A	16-06-1995
		AT 164594 T	15-04-1998
		DE 69409390 D	07-05-1998
		DE 69409390 T	29-10-1998
		ES 2117197 T	01-08-1998

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05827

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K1/20 C07K14/765 C07K16/06 C07K14/81 C07K14/79

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	HRKAL Z ET AL: "HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF SERUM PROTEINS ON PHENYL SEPHAROSE CL-4B" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 242, Nr. 2, 1982, Seiten 385-388, XP000946223 ISSN: 0021-9673	1-21
Y	Seite 385, Absatz 3; Abbildungen 1-3; Tabelle I --- -/--	18-21, 27-29



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. September 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/10/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cervigni, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GOHEEN S C ET AL: "PURIFICATION OF HUMAN SERUM GAMMA GLOBULINS BY HYDROPHOBIC INTERACTION HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, Bd. 326, 1985, Seiten 235-241, XP000946239 ISSN: 0021-9673 in der Anmeldung erwähnt	1-21
Y	Seite 236, letzter Absatz; Abbildungen 1A, 1B, 3, 5	18-21, 27-29
Y	US 5 429 746 A (SHADLE PAULA J ET AL) 4. Juli 1995 (1995-07-04) Ansprüche	18-21, 27, 29
Y	EP 0 339 919 A (GREEN CROSS CORP) 2. November 1989 (1989-11-02) Ansprüche	18-21, 28, 29
Y	EP 0 717 049 A (AIMA DERIVATI SPA ; SCLAVO SPA (IT)) 19. Juni 1996 (1996-06-19) Ansprüche	18-21
A	SZEPESZ L ET AL: "HIGH PERFORMANCE HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY OF PROTEINS" LC-GC INTERNATIONAL (LIQUID AND GAS CHROMATOGRAPHY), US, EUGENE, OR, Bd. 5, Nr. 11, 1992, Seiten 24-29, XP000350924	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung ... die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05827

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5429746 A	04-07-1995	AU 689552 B	02-04-1998
		AU 1843395 A	04-09-1995
		BR 9507100 A	16-09-1997
		CA 2183888 A	24-08-1995
		CN 1146730 A	02-04-1997
		CZ 9602481 A	16-04-1997
		EP 0746398 A	11-12-1996
		HU 74845 A, B	28-02-1997
		JP 9509658 T	30-09-1997
		NO 963475 A	21-10-1996
		NZ 281480 A	26-06-1998
		WO 9522389 A	24-08-1995
		ZA 9501372 A	24-10-1995
EP 0339919 A	02-11-1989	JP 1275600 A	06-11-1989
		JP 2729484 B	18-03-1998
		JP 2004717 A	09-01-1990
		JP 2678249 B	17-11-1997
		DE 68925918 D	18-04-1996
		DE 68925918 T	02-10-1996
		EP 0682949 A	22-11-1995
		ES 2084599 T	16-05-1996
EP 0717049 A	19-06-1996	KR 139049 B	30-04-1998
		IT FI930260 A	16-06-1995
		AT 164594 T	15-04-1998
		DE 69409390 D	07-05-1998
		DE 69409390 T	29-10-1998
		ES 2117197 T	01-08-1998